

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el
epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Juan Carlos Dionisio Córdova

Lima – Perú

2012

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Manchego Sayán, por su apoyo constante durante estos años y por haberme brindado la oportunidad de trabajar en un ambiente de alta calidad científica como el laboratorio de Virología.

A mis asesores Dra. Hermelinda Rivera, MV Mercy Ramírez y MV Kim Lam Chiok por todas las horas dedicadas, por las ideas, las discusiones, sus críticas y todas esas conversaciones en la que he llegado a entender la relación inmunidad humoral – IgA en mucosa intestinal.

A MV Juan More, MV Víctor Roca, Juan Siuce, Cesar Lázaro y técnico Vicente Mercado por su apoyo durante el desarrollo del tema de investigación y por la cantidad de horas dedicadas a los análisis de las muestras.

A los criadores alpaqueros de las comunidades de la provincia de Canchis, Cusco, por su colaboración. El trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Innovación en Ciencia y Tecnología (FINCYT - PIBAP 2008) Contrato N.º 065-2008.

A mis padres Janet y Adolfo, a mis hermanas Jenny y Angie, a mi pareja Liseth, gracias por todo su apoyo y paciencia dada durante esta etapa de mi carrera.

A mis amigos Carla Bardález, Helen Salazar, Luis Ramos, Henry Vega, Carlos Torres, Noe Oviedo etc. Por que en algún momento me cruce con ustedes y me brindaron buenos consejos, ánimos y ayuda cuando creía que la sustentación estaba lejos, gracias por su apoyo.

INDICE

	Pág.
Índice	iii
Resumen	v
Abstract	vi
Lista De Cuadros	vii
Lista De Figuras	viii
 I. INTRODUCCIÓN	 9
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. La mucosa intestinal	11
2.1.1. Barreras fisicoquímicas y celulares propias de la mucosa	12
2.1.1.1. Factores fisicoquímicos	12
2.1.1.2. Factores celulares	13
2.1.2. Interacción bacterias y sistema inmune intestinal	14
2.1.3. Sistema inmune de mucosa del intestino	15
2.1.3.1. Inmunidad innata	16
2.1.3.2. Inmunidad adaptativa	17
2.1.3.3. Estructura del Tejido linfoide asociado al intestino	18
2.2. Las inmunoglobulinas	19
2.2.1. Función	19
2.2.2. Estructura	20
2.2.2.1. Unidad estructural básica: Cadenas ligeras y pesadas	20
2.2.2.2. Parte variable y constante	20
2.2.2.3. Dominios moleculares en las cadenas ligeras y pesadas	21
2.2.3. Regiones hipervariables	21
2.2.4. Hidratos de carbono en la estructura de las inmunoglobulinas	22
2.2.5. Estructura espacial de las inmunoglobulinas	23
2.2.6. Clases de inmunoglobulinas: Isotipos	23
2.3. Inmunoglobulina A (IgA)	24
2.3.1. Estructura	24
2.3.2. Función	25
2.3.3. Síntesis de IgA	25
2.3.4. Receptor de Inmunoglobulina polimérica (pIgR)	26
2.3.5. Mecanismo de expresión de la IgA secretoria	26
2.3.6. Distribución de la IgA	27
2.3.7. Control de producción de la IgA por citocinas	27

2.3.8. Transferencia pasiva de inmunidad vía calostro	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Lugar de estudio	30
3.2. Animales	30
3.3. Obtención y almacenamiento de muestras	31
3.4. Procesamiento de muestras	31
3.5. Obtención de ARN total	31
3.6. RT – PCR	32
3.6.1. Síntesis ADN complementario (ADN c) a partir del ARN total	32
3.6.2. Elección del oligonucleótido	33
3.7. PCR convencional	33
3.8. Electroforesis de los productos del PCR de IgA	34
3.9. PCR en Tiempo Real	34
3.10. Cuantificación Relativa de ARNm de IgA	35
3.11. Análisis estadístico	36
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	49
VII. BIBLIOGRAFÍA	50
VIII. ANEXOS	59

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivos determinar y comparar los niveles de expresión relativa de ARN mensajero (ARNm) de IgA en el epitelio intestinal de las crías de alpacas sanas y enfermas con enteropatía hasta los 45 días de edad. Se muestrearon 70 animales: 35 sanas y 35 enfermas; 5 crías antes del consumo de calostro y 5 por cada semana de edad hasta la sexta semana. Las muestras consistieron en 2 cm de longitud del yeyuno, la cual fue inmediatamente conservada en nitrógeno líquido (-196°C). Se realizó la extracción de ARN total con Trizol®, luego se sintetizó ADN complementario (ADNc). Posteriormente se realizó la PCR convencional y la RT-PCR Tiempo Real empleando oligonucleótidos diseñados para la detección del exón 1 de la región Fc IgA de alpaca. Se realizó la cuantificación de la expresión relativa mediante normalización con ARNm del gen GAPDH y los cálculos de la expresión relativa se realizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Se identificó y demostró mediante la técnica de RT-PCR tiempo real que las alpacas codifican y transcriben ARNm del exón 1 de la región Fc de IgA desde el primer día de edad, mas no al nacimiento; siendo su expresión relativa detectada y producida en el epitelio intestinal de crías de alpacas a partir de un día de edad, tanto en animales sanos como enfermos. Los animales sanos presentan una tendencia de expresión constante de ARNm de IgA hasta la cuarta semana de edad, con disminución discreta en las semanas subsiguientes, mientras que en los cuadros entéricos la producción de ARNm de IgA siempre es superior a lo expresado por los animales sanos, habiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos sanitarios (sanos 38.8 y enfermos 113 veces respectivamente, respecto del calibrador), desde la primera hasta la sexta semana de edad.

Palabras claves:

Camélidos sudamericanos, inmunidad de mucosa intestinal, Inmunoglobulina A, PCR, RT-PCR tiempo real, cuantificación relativa.

ABSTRACT

The present study had as objectives to determine and compare the levels of relative expression of messenger RNA (mRNA) of IgA in intestinal epithelium of newborn alpaca healthy and sick with enteropathy until 45 days old. Surveyed 70 animals: 35 sick and 35 healthy; 5 pups before the consumption of colostrum and 5 for each week of age until the sixth week. The samples consisted in 2 cm of length of the jejunum, which was immediately preserved in liquid nitrogen (- 196°C). The extraction was conducted with Trizol®, then was synthesized complementary DNA (cDNA). Subsequently, it was made the conventional PCR and real time RT - PCR using oligonucleotides designed for detecting the exon 1 of the Fc IgA region of alpaca. The quantification of the relative expression was made through normalization with the GAPDH gene mRNA and the relative expression calculations were conducted using method $2^{-\Delta\Delta C_t}$. It was identified and demonstrated through the real time RT - PCR technique that alpacas encoded and transcribed mRNA of exon 1 of the IgA Fc region from the first day of age, but not at the birth; being its relative expression detected and produced in intestinal epithelium of newborn alpaca from a day of age, both in healthy animals as sick. Healthy animals have a tendency of constant expression of mRNA of IgA until the fourth week of age, with slightly decrease in the subsequent weeks, whereas in enteric diseases IgA mRNA production is always superior than the expressed by the healthy animals, having significant differences ($p < 0.05$) between the two groups (healthy 38.8 and sick 113 times respectively, with regard to the calibrator), from the first to the sixth week of age.

Key words:

South American camelids, intestinal mucosal immunity, immunoglobulin A, real time RT – PCR, relative quantification

LISTA DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1. Secuencia de oligonucleótidos para el Exón 1 de la IgA y GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) empleados en el estudio	33
CUADRO 2. Frecuencia relativa de las temperaturas de disociación (T_m) de los productos obtenidos con los oligonucleótidos para el Exón 1 de la IgA en animales sanos y enfermos	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de PCR para detección del exón 1 de la cadena pesada de IgA	37
FIGURA 2. Análisis de Temperatura de Disociación (T _m) mediante RT-PCR Tiempo Real	38
FIGURA 3. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas y enfermas con respecto al calibrador	39
FIGURA 4. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas	40
FIGURA 5. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas	41
FIGURA 6. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas y enfermas por semana de edad	42

I. INTRODUCCIÓN

La población de alpacas es de 2'900,900 animales distribuidos en la zona central y sur del país, siendo Puno el departamento que cuenta con el 56.94% de esta población, que son criadas por un vasto sector de las comunidades campesinas altoandinas (Bustinza, 2001; FAO, 2005). La crianza tiene importancia económica no sólo por la producción de fibra, sino porque también constituye una fuente de trabajo para el poblador altoandino (Bustinza, 2001). Los problemas de salud animal constituyen uno de los principales factores de pérdidas económicas que afectan a las comunidades alpaqueras y que limitan el incremento de la producción y productividad porque reducen la calidad y cantidad de fibra y carne; y elevan los costos de producción. Uno de los factores de mayor impacto económico es la morbilidad y mortalidad de crías de alpaca ocasionado principalmente por enterotoxemia, neumonías y colibacilosis (Ramírez, 2009).

En general, frente a la invasión de un agente infeccioso por vía digestiva se activa una respuesta inmunitaria a nivel de las mucosas donde la inmunoglobulina A (Ig A) en la mucosa intestinal constituye el principal anticuerpo que limitará la invasión de muchos agentes patógenos (Braathen *et al.*, 2007). La IgA es el isotipo de anticuerpo más predominante en secreciones intestinales (Bernard, 2005). Su producción local constituye entre 70% - 90% de todas las inmunoglobulinas presentes en las secreciones intestinales (Austin *et al.*, 2003), y donde son inducidos, transportados y regulados por mecanismos distintos a los de una respuesta sistémica (Zaldivar, 2002). Debido a su presencia cerca de las membranas externas, la IgA en la mucosa intestinal constituye una primera línea de defensa frente a microorganismos del ambiente exterior. Se ha postulado que la IgA inhibe la adhesión de microorganismos a la

superficie de las células mucosas, previniendo así, su entrada a los tejidos. Una propiedad de la IgA secretoria es su multivalencia, que se asocia a una gran avidéz por la unión a los antígenos; esto puede resultar relevante en la neutralización de virus (Corthésy y Spertini, 1999; Zaldivar, 2002; Bernard, 2005). En los camélidos sudamericanos, existen escasos estudios que miden la expresión de la IgA en mucosas, tal vez debido a que no existe un método cuantitativo de IgA; debido a esto, el objetivo del trabajo fue determinar la expresión del ARNm de IgA en la mucosa intestinal de crías de alpacas y evaluar su expresión relativa durante los primeros 45 días de edad. Estos hallazgos nos permitirán brindar un aporte al conocimiento de respuesta inmune en esta especie, y posteriormente, dilucidar en que momento de la vida del neonato, éste empieza a producir IgA propio para defenderse de agentes patógenos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La mucosa intestinal

El intestino delgado tiene como principal función la absorción de nutrientes. Está ubicado entre el estómago y el intestino grueso y se divide en tres regiones macroscópicamente diferenciadas: el duodeno, el yeyuno y el íleon. La pared del intestino está formada de cuatro capas concéntricas: la serosa, la muscular, la submucosa y la mucosa (Van Beer *et al.*, 1995; Junqueira, *et al.*, 2000). La mucosa intestinal es la más importante ya que en ella tiene lugar la digestión y absorción de nutrientes y es donde se encuentra el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (Ferrufino *et al.*, 1996). Está constituida por el epitelio y por la lámina propia, que es el tejido conjuntivo laxo ubicado entre el epitelio y la submucosa. El epitelio está formado por células polarizadas adheridas entre sí, dando lugar a una capa celular que reviste la superficie del tejido. Los epitelios no están vascularizados y se abastecen de las secreciones del tejido conectivo (Van Beer *et al.*, 1995; Junqueira, *et al.*, 2000). Las células epiteliales intestinales son la frontera entre la mucosa y la cavidad intestinal, conformando las vellosidades intestinales con un tamaño de entre 0.5 y 1.5 mm. Las vellosidades se continúan en la mucosa con las glándulas intestinales o criptas de Lieberkühn. En la cripta hay células con alta tasa de replicación que se desplazan hacia la vellosidad sustituyendo continuamente sus células (Ferrufino *et al.*, 1996; Junqueira, *et al.*, 2000; Velasco, 2006)

Además, el intestino es particularmente vulnerable como lugar de infección y como puerta de entrada al resto del organismo, ya que para mantener la función digestiva posee una enorme superficie entre 200 a 400 m², formada por las vellosidades tapizadas de enterocitos

((Brandtzaeg *et al.*, 1999; Zaldivar, 2002). La integridad de esta capa de enterocitos se mantiene a pesar de que toda la superficie se recambia cada 2-3 días (Van Beer *et al.*, 1995; Isolauri, 2001). Ya desde el nacimiento del animal, se ponen en marcha mecanismos madurativos y adaptativos para mantener una barrera mucosa intestinal íntegra y activa e incorporar una población bacteriana normal estable (Ruiz *et al.*, 2010).

2.1.1.- Barreras fisicoquímicas y celulares propias de la mucosa intestinal

A fin de preservar la integridad intestinal, el sistema inmunológico y las células epiteliales de las superficies mucosas, han evolucionado conjuntamente para formar una barrera contra los agentes luminales (Abbas *et al.*, 2000). Es así que el intestino posee muchas armas fisicoquímicas de protección para la invasión microbiana, que incluyen los movimientos peristálticos, secreción de mucus, sales biliares, enzimas digestivas, y proteínas secretadas; y celulares, como las células epiteliales, dendríticas, polimorfonucleares, etc. (Isolauri, 2001; Zaldivar, 2002).

2.1.1.1. Factores fisicoquímicos

El mucus está compuesta de productos secretados que lubrican y protegen la superficie epitelial apical, por consiguiente juega un rol importante en la mucosa gastrointestinal ya que es el primer sitio de contacto de antígenos (Podolski, 1999), unidas a las secreciones biliares y pancreáticas son parte del complejo fisicoquímico de defensa de la mucosa gastrointestinal (Yuan *et al.*, 2004), ya que los potenciales patógenos son atrapados en el mucus y son eliminados por los movimientos peristálticos del intestino (Hecht, 1999; Mayer, 2003).

Las uniones estrechas son un mecanismo importante en la defensa de la capa epitelial intestinal, ya que previenen el pasaje de antígenos a la capa subyacente (Podolski, 1999; Mayer, 2003). Dentro de los componentes estructurales de las uniones estrechas se encuentran: ocludinas, cingulinas, zónula ocludens y otras proteínas; sin embargo, el conocimiento de los factores reguladores de las uniones estrechas es incompleto y se requieren mayores estudios (Podolski, 1999; Oswald, 2006).

Las enzimas proteolíticas, el efecto emulsificante de las sales biliares, tienen un efecto potente para alterar la composición de los antígenos. El factor trefoil, es una familia de péptidos que colaboran a fortalecer la barrera epitelial y promover su restauración si ocurre algún daño;

en ausencia de mucus y del factor trefoil, el hospedador es más susceptible a inflamación y pierde capacidad de reparar los daños en la mucosa (Mayer, 2003).

2.1.1.2. Factores celulares

Debido a su localización anatómica, la célula epitelial intestinal juega un papel importante en la inmunomodulación del intestino, ya que constituye la puerta de entrada para los antígenos lumenales bacterianos (Oswald, 2006). Existen varios tipos celulares en la mucosa intestinal, como las denominadas células M (membranosas), que tienen como función facilitar el pasaje y realizar el transporte controlado de antígenos a las células del sistema inmune, con el objetivo de inducir su activación, proliferación, diferenciación y la memoria inmunológica (Maris, 2004). Se localiza entre la capa de células epiteliales que revisten la mucosa, tienen un pobre borde en cepillo en su extremo apical, gran capacidad endocítica, sirven como medio de transporte de antígenos lumenales, son unidades funcionales que constituyen sitios de inducción para respuestas inmunes ya que se encuentran yuxtapuestos a linfocitos en su superficie basolateral (Hathaway y Kraehenbuhl, 2000); sin embargo, son también una potente vía para invasión de patógenos (Lu y Walker, 2001).

Las células dendríticas son las centinelas naturales del sistema inmune, siendo las encargadas de iniciar la respuesta inmune frente a la presencia de células alteradas del huésped y/o a la invasión de patógenos (Belmonte *et al.*, 2007). Su objetivo no es la destrucción de los patógenos, sino la presentación de antígenos al sistema inmune adquirido (Yuan y Walker, 2004). Por consiguiente, al ser las principales células presentadoras de antígenos (CPA) son importantes tanto en la estimulación, activación como en la regulación de la respuesta de los linfocitos T (Banchereau y Steinman, 1998). Las células dendríticas como CPA son abundantes en la mucosa intestinal, están localizadas en tejidos linfoides organizados de placas de Peyer y lámina propia; y son responsables de activar ciertas vías innatas y respuestas inmunes adquiridas (Kaiserlian *et al.*, 2005).

En el epitelio del tracto intestinal existen células madres en la parte inferior de cada cripta del Lieberkum que se dividen asimétricamente para dar lugar a nuevas células madre y a células proliferantes. Cuando las células proliferantes se han dividido, dan lugar a células especializadas, que pueden ser enterocitos, células enteroendocrinas, células caliciformes y células de Paneth. Si se transforman en células de Paneth migran al fondo de la cripta, pero si se transforman en cualquiera de los otros tres tipos celulares, migran hacia lo alto de la vellosidad, donde serán eliminados varios días después (Traber y Silberg, 1996).

Las células absorbentes o enterocitos, constituyen el 90% de células dirigidas hacia el lumen, cuya función principal es la absorción de nutrientes (Van Beer *et al.*, 1995; Ferrufino *et al.*, 1996), descienden de una línea celular progenitora (célula madre) en las criptas de Lieberkühn, y son constantemente renovados a lo largo de toda la vida del organismo (Ouellette, 1999), las células epiteliales son reemplazados cada 2 a 3 días, los cuales son perdidos por exfoliación y/o apoptosis, lo que permite no solo su renovación, sino la remoción de potenciales patógenos adheridos a ellos (Isolauri, 2001).

Las células de Paneth constituyen del 3 al 7% de las células epiteliales especializadas en el intestino delgado, y están localizadas en las criptas de Lieberkühn. Presentan una tasa de recambio celular mucho más bajo que los otros tres tipos celulares (tres semanas frente a unos pocos días) (Ferrufino *et al.*, 1996; Karlsson *et al.*, 2008). Producen polipéptidos antimicrobianos como lisozima y defensinas, que eliminan bacterias y virus; y por su capacidad fagocítica, se cree que su función es la regulación de la flora microbiana intestinal (Ferrufino *et al.*, 1996; Traber y Silver, 1996). Debido a esto las células de Paneth son consideradas componentes claves de la inmunidad de mucosa intestinal (Ouellette y Selsted, 1996; Yuan y Walker, 2004). En un estudio histológico del intestino delgado de alpacas adultas no se detectó la presencia de células de Paneth clásicos generando interrogantes sobre la respuesta inmune innata en esta zona en los camélidos sudamericanos (Montalvo, 1996).

2.1.2. Interacción bacterias y sistema inmune intestinal

El intestino está habitado por un complejo y dinámico ecosistema bacteriano, los mamíferos coexisten con un estimado de 300-500 especies de bacterias comensales que colonizan el hábitad intestinal (Hornef *et al.*, 2002; Guarner, 2007). El ecosistema microbiano incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo (Guarner y Malagelada, 2003). Las bacterias nativas se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, mientras que las bacterias en tránsito se ingieren continuamente a través de los alimentos, bebidas, etc. (Guarner, 2007).

Inmunológicamente, cuando el intestino de mamíferos es colonizado por nuevas especies bacterianas tras el nacimiento, aumenta el número de células plasmáticas a lo largo del intestino, la producción de anticuerpos circulantes específicos y naturales anti-bacterias, se estimula la producción en los centros germinales de las placas de Peyer de células B antígeno-específicas

(Cebra *et al.*, 1998) y promueve la maduración y acumulación de linfocitos en el epitelio asociado a las placas de Peyer (Yamanaka *et al.*, 2003). Además de formar una barrera física de membranas celulares y uniones estrechas, el epitelio dispone de métodos activos para reprimir a las bacterias siendo capaz de discriminar entre la flora residente y los microorganismos patógenos. Las vías y métodos de señalización que determinan estas funciones de interacción son lo que se ha denominado epitelio-bacteria (Lu y Walker, 2001).

En ausencia de microflora intestinal, los animales presentan un sistema inmune intestinal infradesarrollado: disminución de las placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos sin centros germinales ni células plasmáticas, quimiotaxis y actividad natural killer macrofágica disminuida y un número muy reducido de linfocitos intestinales (Butler *et al.*, 2000). Además, estos animales producen poca IgG y no IgA; así mismo, se inhibe la formación de granulocitos en la médula ósea. Sin embargo, cuando se les introduce en un ambiente convencional “contaminado”, el sistema inmune intestinal se desarrolla rápidamente y comienza la producción de una gran variedad de isotipos de anticuerpos, incluyendo anticuerpos específicos contra las bacterias de la propia flora (Butler *et al.*, 2000; Guarner, 2007). En pocos términos, la interacción entre el epitelio y la flora es esencial para el desarrollo normal del sistema inmune tanto humoral como celular a lo largo de toda la vida. (Elson *et al.*, 2001).

2.1.3. Sistema inmune de mucosa del intestino

El sistema inmunitario de las mucosas, desarrollado en los mamíferos superiores, se encuentra en constante desarrollo desde el nacimiento y su función está influenciada por factores maternos, ambientales, dietéticos y conductuales (Austin *et al.*, 2003). En cuanto al sistema inmune de mucosa del intestino, éste presenta propiedades únicas como estar expuesto a una gran variedad y cantidad de antígenos, desarrollar una actividad inmunológica permanente y mantener un microambiente fisiológicamente desviado hacia respuestas antiinflamatorias (Porporatto *et al.*, 2007).

El sistema inmune común a mucosas actúa en dos fases para dar respuesta a las agresiones que recibe el organismo. En primer lugar actúa la respuesta inmune innata, que es una primera barrera que se establece mientras se crea la respuesta inmune adaptativa, donde los linfocitos T y B lucharán específicamente contra el agente agresor (Yuan y Walker, 2004). Así, el sistema inmune común de mucosas se divide en sitios inductores tales como placas de Peyer, nódulos linfoides mesentéricos, folículos linfoides aislados; donde el antígeno es localizado, endocitado,

procesado y presentado a los linfocitos T y B; mientras que en los sitios efectores: lámina propia y epitelio intestinal, ocurre la secreción de anticuerpos (Mowat, 2003; Porporatto *et al.*, 2007). La actividad conjunta de los sitios inductivos y efectores genera a nivel de mucosa y suero una respuesta rica en IgA y una inmunidad celular con funciones citotóxicas, regulatorias y de memoria (Porporatto *et al.*, 2007).

2.1.3.1. Inmunidad innata

La función esencial de la inmunidad innata es su capacidad de provocar una respuesta rápida contra el microorganismo patógeno sin necesidad de inducción o maduración de linfocitos, por lo que constituye la primera línea de defensa contra las enfermedades infecciosas (Janeway y Medzhitov, 2002; Tizard, 2002). En contraste a la inmunidad adquirida, la respuesta inmune innata no es específica del patógeno que invade y no genera memoria inmunológica (Strieter *et al.*, 2002; Yuan y Walker, 2004).

Las células que forman el sistema inmune innato son los macrófagos, las células dendríticas y las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés: natural killer) (Janeway, 2002). En el macrófago, célula presentadora de antígeno, el microorganismo es degradado y los fragmentos que resultan se presentan al linfocito T para iniciar la activación de la respuesta inmune adaptativa y el establecimiento de una inmunidad protectora a largo plazo creando una intersección entre los dos tipos de inmunidad. Las células dendríticas son más eficientes como células presentadoras de antígeno que los macrófagos, pues sus lisosomas degradan en menor grado a los antígenos en comparación a los macrófagos (Summerfield *et al.*, 2003; 2009).

La respuesta inmune innata utiliza receptores que reconocen patrones moleculares específicos y que se encuentran a nivel de la superficie celular. Un tipo de estos receptores son los llamados receptores tipo peaje: TLR (del inglés: Toll Like Receptor). Estos TLR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos: PAMP (del inglés “Pathogen Associated Molecular Patterns”), que son estructuras moleculares comunes a diferentes patógenos (Teixeira *et al.*, 2002). De esta manera, cuando un TLR reconoce a su PAMP específico se produce una rápida activación que conlleva cambios a nivel intracelular que establecerán la activación de la respuesta inflamatoria (Jiang *et al.*, 2004; Cummings, 2004).

Las células que presentan TLR son los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos (Nathanson *et al.*, 2007). En la actualidad se conocen 11 TLR diferentes en mamíferos. Entre

los diferentes PAMPs se encuentran: peptidoglicanos (TLR2), ARN de doble cadena (TLR3), lipopolisacáridos (TLR4), flagelina (TLR5), ARN de cadena simple (TLR7 y TLR8) y ADN bacteriano con secuencias dinucleotídicas de citosina fosfato guanina (CpG-ODN por sus siglas en inglés), (TLR9) (Medzhitov, 2001; O'Neill, 2004).

2.1.3.2. Inmunidad adaptativa

Además de la inmunidad innata, en el organismo se ha desarrollado un sistema inmune adquirido o adaptativo para proteger las superficies mucosas. Al contrario de lo que sucede con la inmunidad innata, la inmunidad adquirida es específica contra el antígeno y genera memoria inmunológica, por lo que induce una defensa duradera (Janeway, 2002; Strieter *et al.*, 2002).

Este tipo de inmunidad está protagonizado por los linfocitos B y T efectores. Las células efectoras B son las células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas y realizan su acción mediante la inmunoexclusión e inmunoeliminación de los antígenos por los anticuerpos, IgG e IgM a nivel sistémico y del tipo IgA secretora producida localmente a nivel intestinal. Las células plasmáticas intestinales productoras de IgA derivan de las células B localizadas en las placas de Peyer o en los folículos solitarios (Fagarasan y Honjo, 2003). El proceso se inicia mediante el contacto del antígeno con las células presentadoras que lo procesan y presentan a los linfocitos de las placas de Peyer y de los folículos, generando la proliferación de un clon antígeno-específico que pasa a sangre, se distribuye como células de memoria sistémicamente y vuelve a la lámina propia donde se aloja de forma definitiva. Ante un nuevo contacto con el antígeno, los linfocitos T proliferan, se desencadena por un lado una respuesta inmune celular y por otro, un estímulo para que los linfocitos B se transformen en células plasmáticas productoras de Ig A secretora antígeno-específica (Fagarasan *et al.*, 2001).

El hecho de que la estimulación de linfocitos antígeno-específicos que se produce localmente en el intestino se haga efectiva también a nivel sistémico, ha dado lugar a un campo muy relevante de investigación como es el de las vacunas administradas oralmente. El proceso de inmunoexclusión de antígenos mediante anticuerpos sucede no sólo en condiciones patológicas (por ejemplo: infección por una bacteria patógena) sino en condiciones fisiológicas. Las células dendríticas retienen bacterias comensales de manera que se induce la producción de IgA específica para eliminar las bacterias evitando su penetración en la mucosa y sin producir una respuesta a nivel sistémico (Macpherson y Uhr, 2004).

2.1.3.3. Estructura del Tejido linfoide asociado al intestino GALT

El GALT está integrado por: las Placas de Peyer (PP), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), los linfocitos de la lámina propia (LPL) y los linfocitos Intraepiteliales (IELs). Estos componentes definen dos compartimentos funcionales diferentes según su papel dentro de la respuesta inmune: uno de inducción de la respuesta (PP y MLN) y otro sitio (el epitelio y en la lámina propia) donde se lleva a cabo la respuesta efectora mediado por los LPL e IELs (Mowat, 2003).

a) Placas de Peyer (PP)

A lo largo de todo el intestino existen acumulaciones linfoides, que aumentan en frecuencia en la zona distal del íleon y en el colon, donde la microflora es más diversa. En la parte terminal del íleon, estas acumulaciones se agrupan en estructuras más grandes formando las PP, que tienen estructura de órganos linfoides secundarios, con zonas definidas de células B y T, aunque domina la zona B. En ellos tiene lugar la activación de células B productoras de IgA (Mowat, 2003).

b) Ganglios linfáticos Mesentéricos (MLN)

Los MLN drenan a través de los capilares linfáticos de las placas de peyer y las acumulaciones linfoides del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). En los MLN, además de ocurrir la respuesta inmune específica, las células B activadas en las placas de peyer terminan de diferenciarse a plasmocitos. Recientemente se ha visto que en ratones atímicos, o en condiciones de linfopenia aguda, también es un sitio de linfopoyesis, particularmente de células T $\gamma\delta$ (Guy-Grand *et al.*, 2003).

c) Linfocitos de Lámina Propia (LPL)

Distintas células leucocitarias se encuentran distribuidas a lo largo de la lámina propia, incluyendo células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y T (LPL-Linfocitos de la Lámina Propia). Los linfocitos T son predominantemente TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ y CD8⁺. También se encuentran en la lámina propia células plasmáticas productoras de IgA, aunque también de IgG e IgM. Los macrófagos y células dendríticas de la lámina propia estarían involucrados en la presentación de antígeno *in situ* (Guy-Grand *et al.*, 2003).

d) Linfocitos Intraepiteliales (IELs)

Los Linfocitos Intraepiteliales (IELs) son una población de células T que se encuentran ubicadas en el epitelio, adheridas a la superficie basolateral de los enterocitos (Ebert, 1990). Los IELs son células memoria, que se cree que llegan al epitelio tras estimulaciones con antígenos provenientes de la dieta y/o de la sangre (Lefrancois *et al.*, 2002), siendo la mayoría de IELs linfocitos T (Ferguson, 1977).

En la mucosa del yeyuno, existe aproximadamente un 85 % de linfocitos intra-epiteliales (IELs) CD8⁺. Tanto en controles como en ensayos los IELs CD8⁺ (90 %) predominan sobre los CD4⁺ (8 %). En linfocitos de lamina propia (LPL) esta proporción se invierte a favor de los CD4⁺ (60% vs 40%) (Selby *et al.*, 1983).

2.2. Las inmunoglobulinas

El término inmunoglobulina se usa frecuentemente intercambiado con el de anticuerpo. Formalmente, un anticuerpo es una molécula que se une a un antígeno conocido, mientras que la inmunoglobulina se refiere a este grupo de proteínas independientemente de que su capacidad de unión sea conocida o no (Tizard, 2002). Por lo tanto, las inmunoglobulinas (Igs) son moléculas proteínicas que desempeñan actividad de anticuerpos, producidas en respuesta a la presencia de una molécula extraña en el organismo. Son sintetizadas por células B y células plasmáticas sensibilizadas, circulan por la sangre y por la linfa donde se unen a los antígenos extraños. Tienen la capacidad de unirse de manera específica con el antígeno, y mediante estas interacciones neutralizan y eliminan patógenos específicos del hospedero (Su *et al.*, 2002).

Las Igs constituyen una gran familia de glicoproteínas que comparten su estructura básica y sus características funcionales (Tizard, 2002). Funcionalmente, pueden caracterizarse mediante su habilidad de unirse a los antígenos y a células especializadas del sistema inmune. Estructuralmente, los anticuerpos están compuestos por una o más copias de una unidad característica que puede describirse como una letra Y (Bernard, 2005).

2.2.1. Función

La función esencial de las inmunoglobulinas es la de unirse al antígeno que indujo su formación (Golsby *et al.*, 2003). De esta manera, las inmunoglobulinas actúan como receptoras

de señales antigénicas. Debido a que las Igs pueden encontrarse insertas en la membrana de los linfocitos, en donde actúan como receptores de las señales de activación antigénicas por su capacidad de reconocimiento del antígeno (Sánchez *et al.*, 1993), o bien pueden colaborar en la destrucción antigénica (Bernard, 2005). La primera función se presenta cuando las inmunoglobulinas se encuentran insertas en la membrana de los linfocitos B (inmunoglobulinas de membrana), y para la segunda requieren la colaboración del complemento, macrófagos, neutrófilos y células NK, que tienen la propiedad de unirse a las inmunoglobulinas (propiedades biológicas) por su extremo Fc (Sánchez *et al.*, 1993; Celada, 1994; Bernard, 2005).

2.2.2. Estructura

2.2.2.1. Unidad estructural básica: Cadenas ligeras y pesadas

Una inmunoglobulina (monómero), consta de cuatro cadenas polipeptídicas glicosiladas de las cuales, dos reciben el nombre de cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), iguales entre sí, unidas por puentes disulfuro que confieren estabilidad a la molécula, y siendo la longitud de las primeras aproximadamente el doble de las segundas (Medina, 2004; Melchers, 2005). Tanto las cadenas pesadas como las ligeras, están formadas por unas estructuras proteicas conservadas denominadas “Dominio de Inmunoglobulinas”. Estos dominios están formados por aproximadamente 110 aminoácidos (Edmundson *et al.*, 1975; Bernard, 2005).

2.2.2.2. Parte variable y constante de las cadenas ligeras y pesadas

Tanto la cadena H como la L de la inmunoglobulina están formadas por dos regiones, la primera de ellas compuesta por unos 110- 120 aminoácidos terminales que definen la región variable (V), que representa la porción de la molécula de anticuerpo que se va a combinar con el antígeno (Knappik *et al.* 2000; Celada, 1994). La segunda región la forman los extremos carboxiterminales de ambas cadenas, que definen las diferentes clases de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas o los tipos de cadena ligera (isotipos) y se denominan región constante (C); que es donde residen las funciones efectoras de las Igs. En estas regiones globulares hay zonas estabilizadas por uniones disulfuro intercadena, que se conocen como dominios. La porción variable recibe este nombre porque la secuencia de aminoácidos difiere de una Ig a otra en un mismo individuo, dependiendo del antígeno reconocido por la misma; por el contrario, la secuencia de cambios en la porción constante es muy baja dentro de los individuos de una especie (Knappik *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2002; Golsby *et al.*, 2003).

2.2.2.3. Dominios moleculares en las cadenas ligeras y pesadas

Los dominios de las Igs se denominan con dos letras seguidas de un número que indica su posición relativa en la molécula. La primera de ellas señala su pertenencia a la porción constante (C) o variable (V) de la misma, mientras que la segunda, indica si se trata de una cadena pesada (H) o ligera (L). La cadena pesada de una Ig consta de cinco dominios denominados VH, CH1, CH2, CH3 y CH4, mientras que la cadena ligera dispone sólo de dos, que se conoce como VL y CL (Su *et al.*, 2002). Además, los dominios estabilizan la estructura cuaternaria de las Igs con fuertes uniones no covalentes (enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, etc.), (Huber *et al.*, 1976). Los camélidos de todo el mundo son considerados especies que poseen características particulares en su sistema inmunitario (De Genst *et al.*, 2006). Se ha reportado la presencia de anticuerpos morfológicamente distintos en los camellos, encontrando un nuevo tipo de inmunoglobulinas carentes de las cadenas ligeras convencionales comparados con los anticuerpos de las demás especies animales (Ramírez, 2009).

2.2.3. Regiones hipervariables

La variabilidad que se encuentra en los dominios V de las cadenas H y L de las Igs no está distribuida de modo uniforme en toda la longitud de estas regiones. Algunos segmentos polipeptídicos cortos muestran una gran variabilidad, y se les denominan regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Estas regiones existen en número de tres en la porción variable de las cadenas ligeras y pesadas (CDR1, CDR2 y CDR3), y participan directamente en la formación de los sitios de combinación con el antígeno. Los estudios realizados sobre la estructura de las inmunoglobulinas revela un patrón común de estructura tridimensional, compartida por los dominios variables y constantes de las cadenas pesada y ligera, llamado patrón de plegamiento básico, en donde las regiones variables de ambas cadenas se encuentran plegadas; de esta forma, los CDRs se colocan juntos para crear una superficie de unión con el antígeno que se denomina paratopo (Knappik *et al.*, 2000).

Otra región de interés de la cadena pesada de las Igs es la llamada región bisagra, responsable de la flexibilidad de la molécula, y que permite que los dos lugares de unión al antígeno, que posee cada monómero, puedan operar independientemente. Esta región consiste en un segmento corto de aminoácido que no presenta estructura de dominio y está localizado entre los dominios CH1 y CH2 y es rico en prolina y cisteína (Tonegawa, 1983; Golsby *et al.*, 2003). Además, la región bisagra presenta la mayor variabilidad entre las clases de Igs. Las

cadenas μ y ϵ no tienen región bisagra, sino un dominio adicional designado $C_{\mu 2}$ y $C_{\epsilon 2}$ respectivamente. Se cree que las regiones bisagra se desarrollaron, por evolución, a partir del dominio $C_{\mu 2}$, reduciéndose profundamente de tamaño (Parvari *et al.*, 1988).

2.2.4. Hidratos de carbono en la estructura de las inmunoglobulinas

Por otra parte, en la estructura de las inmunoglobulinas también juega un papel importante los hidratos de carbono, sobre todo en la región constante de las cadenas pesadas donde la glicosilación está restringida, y en particular en el dominio CH2 y en la región bisagra, aunque aproximadamente el 15% de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) también están glicosiladas. (Leatherbarrow *et al.*, 1985; Golsby *et al.*, 2003). El papel exacto de los hidratos de carbono en las Igs no está del todo claro, pero el hecho de que las clases homólogas de cadenas H entre las especies hayan conservado una gran cantidad de los sustituyentes azucarados, está a favor de un importante papel estructural o funcional. En las Igs que presentan un mayor contenido de azúcares (IgE, IgM e IgA), éstos son importantes para su secreción y expresión en la membrana, mientras que, por ejemplo, la secreción de IgG, que contiene un único oligosacárido, no se altera prácticamente con inhibidores de la glicosilación (Hicrman y Kornfeld, 1978). En algunos casos, la inhibición de la glicosilación aumenta el grado de catabolismo intracelular de las cadenas H. Se ha postulado que una de las principales funciones de la glicosilación es estabilizar las proteínas contra el ataque proteolítico (Olden *et al.*, 1982). Así, por ejemplo, la región bisagra de la cadena *alpha* contiene cinco sitios de glicosilación en una región de 27 aminoácidos, lo cual le hace excepcionalmente resistente a la digestión por proteasas intestinales (Putnam *et al.*, 1979).

La eliminación de los carbohidratos en las Igs altera algunas funciones de estas moléculas. Se ha comprobado que las Igs deglicosiladas conservan su especificidad por el antígeno y la capacidad de unirse a la proteína A de *Staphylococcus aureus* fenómeno este último que requiere la integridad de los dominios CH2 y CH3. Sin embargo, estas Igs pierden o disminuyen su capacidad para unirse a los receptores Fc de los macrófagos, para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y para activar el complemento. Además, los complejos antígeno-anticuerpo que forman las Igs deglicosiladas se eliminan más tarde de la circulación que los formados con Igs glicosiladas (Nose y Wigzell, 1983; Leatherbarrow *et al.*, 1985). Los carbohidratos regulan también el catabolismo de las Igs; su eliminación del suero es modulada por la interacción de sus porciones azucaradas con receptores específicos en el hígado (Winkelhalce y Nicolson, 1976; Peppard *et al.*, 1981).

2.2.5. Estructura espacial de las inmunoglobulinas

Una vez conocida la secuencia primaria de los aminoácidos en las cadenas peptídicas de las inmunoglobulinas, la deducción de la estructura espacial permitió entender la forma en que millones de diferentes sitios de unión al antígeno son construidos sobre una estructura común (Bernard, 2005).

Las inmunoglobulinas pueden estar constituidas por unidades básicas simples (IgG, IgD e IgE), en forma de dímeros (dos unidades básicas unidas), tal como la IgA, incluso por hasta cinco estructuras básicas unidas por sus extremos Fc (fragmento cristizable, de la región constante) como es el caso de la IgM. Esto se debe a la cualidad que tienen las cadenas μ y α de unirse entre sí. Esta unión se realiza a través de la cadena J (glicoproteína con peso molecular de 15 kD), que une extremos Fc mediante puentes disulfuro en las IgA e IgM y mediante puentes de hidrógeno (Bernard, 2005).

2.2.6. Clases de inmunoglobulinas: Isotipos

No todas las inmunoglobulinas de una misma clase tienen idéntica estructura, sino que dentro de las clases se pueden establecer subclases considerando la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas H y el diferente número y situación de los puentes disulfuro intercatenarios establecidos entre las cadenas pesadas. Se pueden distinguir no sólo por sus secuencias sino también por su estructura antigénica a las que dan lugar estas secuencias (Wernery, 2001). Las regiones constantes de las cadenas pesadas de estas diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas se conocen como variantes isotípicas y son las mismas en el suero de todos los individuos normales de la misma especie (Bernard, 2005).

Las inmunoglobulinas pueden ser divididos en cinco isotipos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basados en el número de unidades Y; y en el tipo de cadena pesada. Las cadenas pesadas de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, son conocidas como *gamma*, *mu*, *alpha*, *delta* y *epsilon* (γ , μ , α , δ y ϵ), respectivamente. Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo pueden ser clasificadas como tipo *kappa* (κ) o *lambda* (λ), basadas en pequeñas diferencias estructurales polipeptídicas; sin embargo, las cadenas pesadas determinan el isotipo de cada inmunoglobulina (Tizard, 2002; Bernard, 2005). Los principales isotipos (IgM, IgG, IgA, IgE) han sido aislados y caracterizados en vaca (Fey *et al*, 1976; Butler, 1983; Besser *et al*, 1988), cerdo (Vaerman *et al*, 1971), caballo (Allen y Dalton, 1975), camellos y alpacas (De Genst *et al.*, 2006).

En animales de interés veterinario, es de gran utilidad el estudio del isotipo predominante de Ig para combatir infecciones y otras enfermedades. Además, muchos estudios en inmunología animal han sido llevados a cabo con IgG, IgM o IgA (Wernery, 2001). La IgA secretora, al contrario que la IgG o M, por su estructura, no activa vías de inflamación como la del complemento, lo que la hace ideal para proteger superficies mucosas en continuo contacto con antígenos (Bernard, 2005).

2.3. Inmunoglobulina A (IgA)

Ya desde los años 1870, Alexandre Besredka, un patólogo Ruso descubrió la presencia de inmunoglobulinas en las secreciones externas, específicamente en el tracto gastrointestinal; mediante siguientes investigaciones se le dio a la inmunoglobulina una mayor atención, ya que se reportaba en la mayoría de las secreciones externas, como la leche, fluido intestinal y las heces. Años más tarde Rockey *et al.* (1964) la designó como la inmunoglobulina A (IgA) y desde entonces se ha demostrado que la IgA es un componente importante en la mecanismo de defensa de la mucosa.

La inmunoglobulina A es el isotipo de anticuerpo más predominante en secreciones respiratorias e intestinales (Bernard, 2005). Su producción local constituye entre 70%-90% de todas las inmunoglobulinas presentes en las secreciones intestinales (Austin *et al.*, 2003), y donde son inducidos, transportados y regulados por mecanismos distintos a los de una respuesta sistémica (Zaldivar, 2002).

2.3.1. Estructura

En el suero existe de forma de un monómero (IgA sérica), mientras que en las secreciones aparece mayoritariamente en forma de un dímero de dos unidades monoméricas. Las moléculas de IgA presentes en las secreciones son dímeros que llevan una sola cadena J, con una cadena adicional glicopolipeptídica llamada componente secretor (Phalipon *et al.*, 2002). El componente secretor (CS) está unido de forma covalente en un extremo al dominio CH2, y el otro extremo interactúa de forma no covalente y al mismo tiempo con la cadena J y uno de los dominios CH3 de la cadena pesada (Royle *et al.*, 2003). Los N-glicanos del CS proveen a la IgA sitios de unión a las bacterias, además de que asegura la localización *in vivo* de la IgA secretora mediante su anclaje a las células epiteliales de las superficies mucosales (Phalipon *et al.*, 2002; Braathen *et al.*, 2007).

2.3.2. Función

Debido a su presencia cerca de las membranas externas, la IgA en la mucosa intestinal constituye una primera línea de defensa frente a microorganismos del ambiente exterior. Se ha postulado que la IgA inhibe la adhesión de microorganismos a la superficie de las células mucosas, previniendo así, su entrada a los tejidos. Una propiedad de la IgA secretora es su multivalencia, que se asocia a una gran avidez por la unión a los antígenos; esto puede resultar relevante en la neutralización de virus (Corthésy y Spertini, 1999; Zaldivar, 2002; Bernard, 2005). La función indirecta de IgA es para dar un efecto de protección, al interactuar con la mucina y demás factores humorales de la inmunidad natural presente en las secreciones externas (Russell *et al.*, 2005).

Podría decirse que, la IgA ubicada en el mucus forma una zona de inmunoexclusión pues aglutina antígenos en la malla mucosa e impide la adherencia de bacterias al epitelio, ya que su unión a la bacteria aumenta la afinidad de este complejo a la mucina, lo cual facilita la inmovilización del microorganismo siendo eliminados por la acción mecánica peristáltica (Van der Waaij *et al.*, 2004). Cuando se une a la partícula viral, no solo previene la unión de ésta a la célula huésped mediante el bloqueo de receptores específicos, sino que este encuentro puede ocurrir dentro de la célula epitelial en el momento del transporte mediada por pIgR (receptor de inmunoglobulina Polimérica) de la IgA, siendo capaz de neutralizar virus intracelulares como se ha demostrado *in vitro* con el virus Sendai (conocido como el virus de la parainfluenza 1), virus de la Gripe y los virus de la Inmunodeficiencia Humana (Bomsel *et al.*, 1998; Fujioka *et al.* 1998).

2.3.3. Síntesis de IgA

La IgA se produce a partir de células B en PP y linfocitos intraepiteliales de áreas asociadas al intestino delgado (Austin *et al.*, 2003). Los linfocitos B productores de IgA se activan principalmente en las placas de peyer, y en el centro germinal es donde se produce la proliferación celular, el cambio de isotipo y la hipermutación somática (Fagarasan y Honjo, 2003). Se tiene conocimiento que los antígenos de las bacterias saprófitas y patógenas, activan a las células dendríticas que actúan como células captadoras y presentadoras de antígenos en el epitelio intestinal y que luego migran a las placas de peyer y ganglios mesentéricos regionales para activar a los linfocitos T *helper* y ellos a los linfocitos B a través de la secreción de interleucinas, donde terminan de proliferar y de diferenciarse a células plasmáticas,

denominadas células B efectoras (Walker-Smith, 1990). Los linfocitos B activados migran específicamente a la lámina propia de la mucosa intestinal y secretan la IgA específica produciendo anticuerpos que protegen el epitelio intestinal (Rey *et al.*, 2004). Las IgA secretadas por las células plasmáticas de la lámina propia se transportan hacia el lumen intestinal a través del epitelio. Este transporte transcelular comienza con la unión entre la cadena J (que dimeriza a las IgA) con el receptor polimérico de la Ig (pIgR) en la superficie basal de las células epiteliales. La IgA es transportada hacia el lumen y secretada en forma de dímero luego de que dicho receptor es cortado enzimáticamente, dando lugar al denominado componente secretorio (Austin *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2004).

2.3.4. Receptor de Inmunoglobulina polimérica (pIgR)

El pIgR se expresa en la superficie basolateral de las células epiteliales de la mucosa, y es específica para polímeros de IgA e IgM. El pIgR no tiene ningún papel inflamatorio en la mucosa intestinal y su función principalmente es la transcitosis. Por consiguiente, es responsable de la transcitosis de poliméricos IgA e IgM a través del epitelio mucoso para formar IgA secretora o IgM. La transcitosis la podemos definir como un determinado conjunto de fenómenos, tanto la endocitosis y la exocitosis, que permiten a la IgA polimérica atravesar todo el citoplasma celular desde un polo al otro de la célula epitelial intestinal. (Johansen y Brandtzaeg, 2004).

El pIgR también transporta IgM pentamérica a las secreciones mucosas, aunque en una proporción muy inferior a la IgA (Bernard, 2005). Así mismo, El pIgR también interacciona con la cadena J de ambos tipos de anticuerpos (Brandtzaeg, 1983).

2.3.5. Mecanismo de expresión de la IgA secretoria

Las células plasmáticas intestinales productoras de IgA derivan de las células B localizadas en las placas de Peyer o en los folículos solitarios (Fagarasan y Honjo, 2003). Así, las células plasmáticas secretan dímeros de IgA asociados a una cadena J, estos dímeros de IgA se encuentran mayoritariamente en el tejido conectivo llamado lámina propia, que se sitúa inmediatamente por debajo de la membrana basal de muchas superficies epiteliales. La IgA dimerica se une a un pIgR, que se expresa en la superficie basolateral de la mayoría de las células de los epitelios mucosos (Johansen y Brandtzaeg, 2004; Braathen *et al.*, 2007). El complejo resultante de la unión del dímero de IgA a su receptor polimérico se internaliza por endocitosis mediada por pIgR (Johansen y Brandtzaeg, 2004), y se transfiere a través del

citoplasma de la célula epitelial en forma de vesícula membranosa, la cual se fusiona con la membrana plasmática en el lado luminal de la célula epitelial. (Johansen *et al.*, 2001; Almogren *et al.*, 2007). La porción extramembranal del pIgR se escinde por acción enzimática y se secreta como parte de la molécula de IgA secretora. La parte que envuelve y permanece unido al dímero de IgA secretora (extremo amino-terminal del pIgR del dímero de IgA), se denomina componente secretor (Corthésy y Spertini, 1999; Johansen y Brandtzaeg, 2004). Este componente secretor “tapa” sitios susceptibles de degradación enzimática, tales como las regiones bisagra, y permite una vida media que no sería posible sin tal protección en un medio mucoso, rico en proteasas (Tizard, 2002; Bernard, 2005; Ramírez, 2009). Así, la molécula secretora completa de IgA es un producto sintético de dos tipos celulares, células plasmáticas y células epiteliales (Phalipon *et al.*, 2002).

2.3.6. Distribución de la IgA

La IgA es de gran importancia en la defensa del huésped actuando no sólo contra patógenos de mucosas, sino también contra microorganismos que causan enfermedades sistémicas, muchos de los cuales inicialmente colonizan a través de las superficies mucosas. Parece ser que existen tres sitios mucosos de defensa mediada por IgA secretora:

- El lumen donde la IgA secretoria puede neutralizar bacterias, virus, toxinas y enzimas, así como prevenir la unión viral, la adherencia microbiana y la absorción de antígenos.
- Dentro de las células epiteliales, ya que la IgA dimérica puede unirse a antígenos intracelulares.
- Dentro de la lámina propia la IgA dimérica puede conformar complejos antigénicos y estos complejos pueden ser transportados al lumen (Lamm, 1997).

2.3.7. Control de producción de la IgA por citocinas

Las citocinas son proteínas secretadas por células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa (células dendríticas, macrófagos, células epiteliales, células T CD4+) las cuales son producidas en respuesta a microorganismos y otros antígenos. Las citocinas producidas por las células de la inmunidad innata (TNF- α , IL-6 e IL-1) median las reacciones inflamatorias iniciales y favorecen la eliminación de los microorganismos; mientras que las citocinas producidas durante la inmunidad adaptativa (IL-2, IFN-g, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12), estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos estimulados por antígeno y activan a células efectoras especializadas (Rengarajan *et al.*, 2000).

Considerando la producción de IgA por linfocitos B a nivel de la mucosa, las citoquinas participan en las diferentes etapas de desarrollo de los linfocitos B y son factores esenciales para la proliferación clonal de estas células. En los sitios inductores como el GALT, estas citoquinas se encargan de mediar el cambio de isotipo de anticuerpos, mientras que a nivel de los sitios efectores (Placas de Peyer), se encargan de la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos. En general, las citoquinas que participan en el control del desarrollo de los linfocitos B, particularmente células productoras de IgA, son el Factor transformante del crecimiento β (TGF- β), y las Interleucinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Zaldivar, 2002; Mestecky *et al.*, 2005).

Así también, los factores que favorecen la liberación de IgA a nivel intestinal son el TGF- β , que media el cambio de isotipo o clase de inmunoglobulina A durante el desarrollo y la activación de los linfocitos B. La IL-6, que es un agente inductor de la proliferación de IgA, secretada por las poblaciones de células B. El factor de necrosis tumoral (TNF- α), induce la liberación del componente secretor que protegerá a las moléculas diméricas de IgA a nivel intestinal (Mestecky *et al.*, 2005).

2.3.8. Transferencia pasiva de inmunidad vía calostro

La supervivencia de los animales recién nacidos depende de la transferencia pasiva de inmunidad que reciben de la madre a través de la placenta, calostro o leche. Entre los elementos transferidos que han demostrado tener un efecto de inhibición o destrucción directa de diversos microorganismos se encuentran la lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa, citoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos, células linfoides y no linfoides. Debido a que el sistema inmune del neonato es todavía inmaduro, las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM transferidos vía calostro son de suma importancia para su supervivencia, pues neutralizan los patógenos en las mucosas o inmediatamente después de la invasión. Pero una limitancia que presenta el neonato es que el epitelio intestinal es permeable durante pocas horas, permitiendo el paso de las inmunoglobulinas a la sangre, pero esta permeabilidad decae a partir de las 24 horas. (Porter, 1969; Klobasa *et al.*, 1986; Tizard, 2002).

Experimentos en conejos neonatos han demostrado claramente que la IgA secretora es el factor antimicrobiano más importante en la leche materna (Dickinson *et al.*, 1998), mientras que el modelo de transporte dependiente del receptor polimérico de inmunoglobulina (pIgR)/CS, explica porqué el calostro y la leche materna son fuentes ricas en IgAs. La elevada concentración de IgA secretora en calostro sustenta fuertemente el hecho de que esta

inmunoglobulina ejerce una importante función en la protección inmune pasiva contra las infecciones gastrointestinales. Debido a su importante función en la protección de la mucosa intestinal, la IgA secretora es un candidato ideal para ser empleado como agente profiláctico y terapéutico (Bradtzaeg, 1983).

Los camélidos de todo el mundo son considerados especies que poseen características particulares en su sistema inmunitario (De Genst *et al.*, 2006). La IgA en la leche de los camélidos se encuentra en forma de IgA secretora; sin embargo, los niveles de ésta inmunoglobulina en la leche de camélidos es mucho más baja que la IgG total (Medina *et al.*, 2004). En bovinos, la IgA representa alrededor del 7% (no se absorben) de la concentración total de inmunoglobulinas presentes en el calostro, mientras que la IgG es alrededor del 85-90 % aunque la absorción de ésta se da en las primeras 6 horas de vida (Porto *et al.*, 2007). Además, el tipo de placenta epiteliocorial de los camélidos previene el pasaje de inmunoglobulinas al feto, similar a los rumiantes (Weaver *et al.*, 2000). Por lo tanto, los animales neonatos nacen hipogammaglobulinémicos y su capacidad de resistencia contra los patógenos depende de una adecuada absorción del calostro y la leche (De Genst *et al.*, 2006), siendo la inmunización pasiva a través del calostro crucial (Ramírez, 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología sección Virología, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), ubicado en la ciudad de Lima, distrito de San Borja.

3.2 Animales

Se tomaron como muestras los tejidos de 35 crías de alpacas aparentemente sanas; 5 crías antes del consumo de calostro y otros 5 por cada semana de edad hasta la sexta semana; y 35 crías de alpacas con enteropatía. Ambos grupos de animales (sanos y enfermos) fueron subdivididos según su edad en semanas, habiendo por lo menos 5 individuos por grupo etario. Todos los grupos se establecieron de la siguiente manera:

Grupo 0:	Crías de alpaca recién nacidas pre-calostro.
Grupo 1:	Crías de alpaca de 1 día de edad (Calibrador)
Grupo 2:	Crías de alpaca de 2 a 7 días de edad
Grupo 3:	Crías de alpaca de 8 a 14 días de edad
Grupo 4:	Crías de alpaca de 15 a 21 días de edad
Grupo 5:	Crías de alpaca de 22 a 28 días de edad
Grupo 6:	Crías de alpaca de 29 a 35 días de edad

Grupo 7: Crías de alpaca de 36 a 45 días de edad

Todos los animales procedieron de la Estación Experimental IVITA - Maranganí, provincia de Canchis, departamento de Cusco y de comunidades campesinas de zonas aledañas en el año 2009 y 2010.

3.3. Obtención y almacenamiento de muestras

Se obtuvieron muestras de 2 centímetros de longitud de la porción media del yeyuno, las cuales fueron lavadas en suero fisiológico estéril al 0.85% para retirar el contenido intestinal y luego almacenadas inmediatamente en nitrógeno líquido a -196°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

3.4. Procesamiento de muestras

Las muestras de tejido fueron descongeladas bajando la temperatura de forma paulatina desde -196°C a -20°C , luego a -4°C , para luego realizar el raspado profundo de la mucosa con hoja de bisturí. El raspado, conteniendo células de la mucosa intestinal, fue resuspendido en 1 ml de agua libre de nucleasas y centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior 3 veces. Finalmente, el pellet obtenido fue resuspendido en 1ml de agua libre de nucleasas, conservándose a -70°C hasta su uso en la obtención de ARN total.

3.5. Obtención de ARN total

Se empleó el reactivo Trizol (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ARN total a partir del pellet obtenido de los raspados yeyunales de todos los animales. Brevemente, el método del Trizol se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y membranas, y la separación de la muestra en una fase acuosa y otra orgánica. Seguidamente se procede a la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa, lavado con alcohol al 75%, y finalmente el ARN fue reconstituido en 60 μl de agua libre de nucleasas. El ARN total obtenido se mantuvo a -70°C hasta su uso.

El ARN fue tratado con 2UI DNasa (Promega, USA) para eliminar la presencia de ADN contaminante proveniente de las muestras.

3.6. RT - PCR

3.6.1. Síntesis ADN complementario (ADN c) a partir del ARN total

De cada muestra de ARN total se realizó una transcripción reversa (RT) utilizando el “Kit SuperScript™ *III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen, USA), que utiliza una transcriptasa reversa y una solución conteniendo nucleótidos, cloruro de magnesio, sales tampón, hexámeros al azar y oligos dT.

Se preparó el Master Mix para un volumen de reacción final de 20 µl y fueron agregados en el siguiente orden y concentración:

2x RT Reaction mix	10 µl x n*
RT enzyme mix	2 µl x n
Agua libre de nucleasas	5.5 µl x n
Hexámeros al azar	0.5 µl x n

*Donde “n” significa el número de muestras a trabajar.

Seguidamente, se dispusieron los tubos MJ White para termociclador con sus respectivas tapas y se colocó 18 µl del Master Mix a cada tubo. Una vez hecho esto, se adicionaron 2 µl de ARN, para obtener un volumen final de reacción de 20 µl. Las muestras fueron llevadas al termociclador Thermal Cycler PTC-200 Chromo 4 (MJ Research, USA) programado por un solo ciclo donde se siguió el siguiente protocolo: 25 °C por 10 minutos (extensión de cebadores), 50 °C por 30 minutos (síntesis de ADNc), 85 °C por 5 minutos (término de la reacción al inactivar la transcriptasa) y 4°C indefinidamente para enfriar la muestra. Se añadió 2 UI de RNasa H de *E.coli* (proveído por el kit) a cada pocillo y se incubó a 37 °C por 20 minutos para destruir la molécula ARN del híbrido ARN: ADNc. El ADNc obtenido fue congelado a -70°C hasta su uso en la reacción de PCR Tiempo Real. El software utilizado es denominado Opticon Monitor 2 v 2.0.3.

3.6.2. Elección del oligonucleótido

Para la detección del Exón 1 de IgA, se emplearon los oligonucleótidos diseñados por el programa Primer3 Output (www.primer3.com) en el Exon 1 de IgA a partir de la secuencia publicada en el Banco de Genes para la línea germinal de alpaca (AM773729.1). Asimismo, se empleó el programa BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) para encontrar las regiones conservadas de la línea germinal de alpaca realizando comparaciones y demostrando su especificidad (Ver anexo I y II). Se utilizaron también oligonucleótidos específicos para el gen GAPDH (gliceraldehído 3 – fosfato deshidrogenasa) (Patil *et al.*, 2004) usado como control endógeno.

Las secuencias de los oligonucleótidos de IgA y GAPDH fueron las que siguen:

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos para el Exón 1 de la IgA y GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) empleados en el estudio

Gen	Longitud (pb)	Secuencia	T° hibridación
IgA	164	F: 5' AACGTGTCCGTCATGGACTT 3'	60.4 °C
		R: 5' GGTAGTTGGGCATGTTGATC 3'	
GAPDH	356	F: 5' GTGAAGGTCGGAGTGAACG 3'	60.0 °C
		R: 5' GAGATGATGACCCTCTTGGC 3'	

3.7. PCR convencional

La técnica de PCR se hizo primero mediante el método convencional para comprobar la identidad del producto de acuerdo a su longitud en pares base. Seguidamente, 2µl de cada ADNc junto con los oligonucleótidos específicos para el gen de la cadena pesada de la IgA (gen Alfa) fue amplificado con el Kit *GoTaq® Green Master Mix* (PROMEGA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Teniendo en cuenta que la concentración final de ambos oligonucleótidos fue de 0.2µM. Las cantidades finales de los componentes para la preparación del Master Mix de la PCR convencional en un volumen de reacción final de 25 µl fueron agregados en el siguiente orden y concentración:

Agua libre de nucleasas	9.5 µl x n*
Go Taq Hot start master mix	12.5 µl x n

Primer forward (10 μ M)	0.5 μ l x n
Primer reverse (10 μ M)	0.5 μ l x n

*n significa el número de muestras a trabajar.

Se colocó 23 μ l del Master Mix y se agregó 2 μ l del ADNc obtenido en el paso anterior. Se colocaron los viales en el termociclador Thermal Cycler PTC-200 Chromo 4 (MJ Research, USA). El protocolo para el termociclador fue de 94°C por 2 minutos para la desnaturalización inicial, luego se continuó 40 ciclos de: 94°C por 20 segundos, 56°C por 20 segundos y 72°C por 40 segundos. Terminado los 40 ciclos se realizó una extensión final de los productos a 72°C por 5 minutos, finalizando la reacción a 14 °C.

3.8. Electroforesis de los productos del PCR de IgA

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis usando una cámara de tipo horizontal con geles de agarosa al 1.5 % en TBE 1X. Se colocaron 25 μ l de los productos de la PCR y se adicionaron 5 μ l de buffer de carga cada una de las muestras, para luego ser colocadas en los carriles del gel. Un carril fue utilizado por el marcador de peso molecular Perfect DNA 1 kb Ladder de la marca Novagen (USA). La electroforesis se realizó a 100V por 1 hora, luego de lo cual, las bandas de ADN teñidas con bromuro de etidio fueron visualizadas en un transiluminador UV (UltraLum, USA).

3.9. PCR en Tiempo Real

Dos microlitros de cada ADNc de los ARN obtenidos durante la síntesis (del RT) fueron utilizados para realizar un PCR Tiempo Real, utilizando el kit *SuperScript™ III Platinum® SYBR® Green Two-Step qRT-PCR Kit with ROX* (Invitrogen, USA), Utilizando como fluoroforos marcadores de ADN doble hebra al agente intercalante SYBR Green y el colorante Rox utilizado como referencia pasiva; un ADN polimerasa (*Taq* polimerasa). Se prepararon los master mix mediante la mezcla de sus diferentes componentes en tubos eppendorf de 2ml de capacidad en el siguiente orden y concentración para un volumen final de 20 μ l x reacción/tubo, teniendo en cuenta que la concentración final de los oligonucleótidos específicos de región del gen codificante de la cadena alfa de la IgA de alpaca fue de 0.2 μ M:

Se preparó un master mix, como se detalla a continuación:

Agua libre de nucleasas	6.2 $\mu\text{l} \times n^*$
SYBR Green super mix	10 $\mu\text{l} \times n$
Primer Forward (10 μM)	0.4 $\mu\text{l} \times n$
Primer Reverse (10 μM)	0.4 $\mu\text{l} \times n$
ROX diluido (1:10)	1 $\mu\text{l} \times n$

*n significa el número de muestras a trabajar.

El Master Mix fue mantenido en hielo hasta su uso. Se dispusieron tubos nuevos MJ White para la reacción (PCR) y se dispensó 18 μl del Master Mix en cada uno de los tubos. Se transfirió 2 μl de ADNc de cada una de las muestras, producto de la reacción de síntesis de ADNc, que representa el 10% del volumen final como señala el fabricante. Las tiras de tubos MJ White fueron colocadas en el termociclador PTC 200 (Peltier therme cycler) Chromo 4 (detector continuo de fluorescencia) de MJ Research programado con el siguiente protocolo: 50 °C por 2 minutos (Incubación con UDG), 95 °C por 2 minutos (Inactivación UDG y activación de DNA polimerasa), seguido de 40 ciclos de: 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto. Los productos fueron leídos por el termociclador para PCR tiempo real generando una curva de amplificación o ciclo umbral (Ct) y una curva de disociación (Tm), determinando su especificidad. El software empleado fue Opticon Monitor 2 v2.0.3.

Los ARNm fueron cuantificados teniendo al gen GAPDH (Patil *et al.*, 2004) como gen constitutivo celular y referente de la eficiencia de la amplificación que se usaron como normalizador de los niveles de ARNm en todas las muestras. Los resultados del RT-PCR tiempo real usando oligonucleótidos diseñados para el ARNm de la IgA consideraron como positivas, a aquellas muestras con una curva de amplificación clara (Ct), y una curva de disociación única (Tm) sin ruido de fondo que representen productos inespecíficos.

3.10. Cuantificación Relativa de ARNm de IgA

Los resultados de RT-PCR tiempo real se pueden presentar como cuantificaciones absolutas o relativas. En la cuantificación absoluta se requiere la preparación de curvas patrón estándar con cantidades exactas del producto a analizar. La cuantificación relativa permite el análisis de resultados de una forma mucho mas sencilla usando métodos matemáticos (Pfaffl, 2001).

La cuantificación relativa de los resultados de ARNm de IgA se realizó con el Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ o también llamado Método Ct comparativo (Livak y Schmittgen, 2001). El método se basa en el análisis comparativo de los Cts de las muestras, comparados con el Ct de un control endógeno (en nuestro caso los Cts de las muestras usando el set de oligonucleótidos *GAPDH*). La fórmula se presenta a continuación:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador
 $\Delta\Delta Ct$ = Diferencia entre el control endógeno y el ARNm a analizar con respecto al calibrador

En este método los resultados son presentados como cantidades en número de veces con respecto a un calibrador (crías de alpaca de 1 día de edad). De esta forma se obtuvo los niveles de expresión de ARNm de la IgA con respecto a un calibrador. Los resultados se expresan en número de “más veces” expresado que la muestra control (calibrador).

3.11. Análisis estadístico

Se empleó la prueba estadística de T-Student para determinar la diferencia significativa en la expresión de ARNm de IgA entre los grupos sanitarios (sanos y enfermos). Para establecer la diferencia significativa de expresión de ARNm de IgA entre los grupos etarios dentro de cada grupo sanitario se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar aquellos grupos diferentes. Finalmente, se empleó la prueba de T de Student para establecer diferencia significativa entre grupos etarios y estado sanitario. Los datos se procesaron mediante el paquete estadístico STATA versión 11.0 estableciendo la significación estadística en 0.05.

IV. RESULTADOS

4.1. PCR convencional

Los resultados del PCR convencional usando los oligonucleótidos diseñados para el ARNm de la IgA evidenciaron la amplificación de un producto específico de 164pb aproximadamente a partir de ADNc obtenido, observado mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con Bromuro de Etidio. No logró observarse diferencia entre los productos obtenidos de muestras de animales sanos y enfermos a través de la técnica convencional, ni tampoco diferencias por edad (Figura 1).

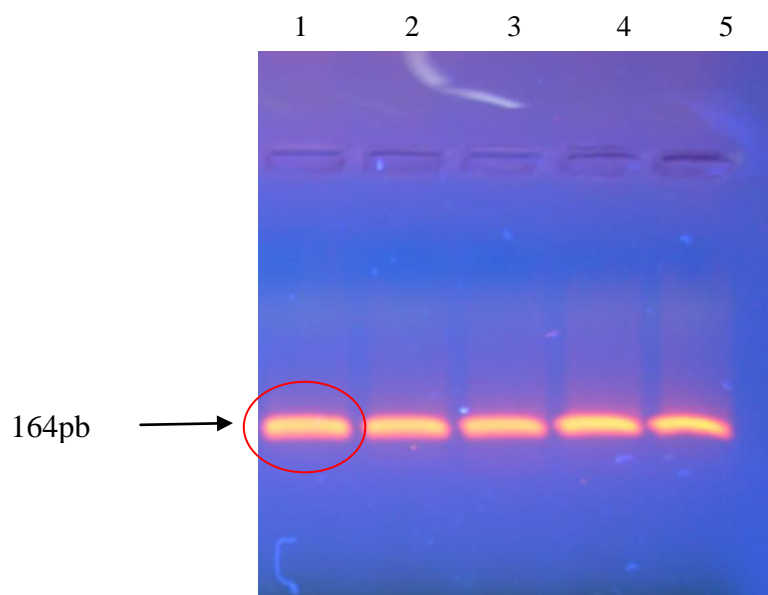


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de PCR para detección del exón 1 de la cadena pesada de IgA. 1: Alpaca sana 5 días de edad, 2: Alpaca sana 01 día de edad, 3: Alpaca sana 23 días de edad, 4: Alpaca enferma 24 días de edad, 5: Alpaca sana 35 días de edad.

4.2. Expresión del ARNm de la IgA

El RT-PCR Tiempo Real demostró que de las 77 muestras evaluadas (40 sanos y 30 enfermos con enteritis), en el 27% (21/77) no se detectó la expresión de ARNm de IgA. De estas alpacas, el 25% (10/40) pertenecen a los animales aparentemente sanos que incluyen a los animales neonatos que no han consumido calostro después del nacimiento; mientras que el 30% (11/37) de los animales enfermos tuvieron el mismo desempeño.

El análisis de temperatura de disociación (T_m) identificó temperaturas de disociación muy cercanas entre sí entre los amplicones resultantes (Figura 2).

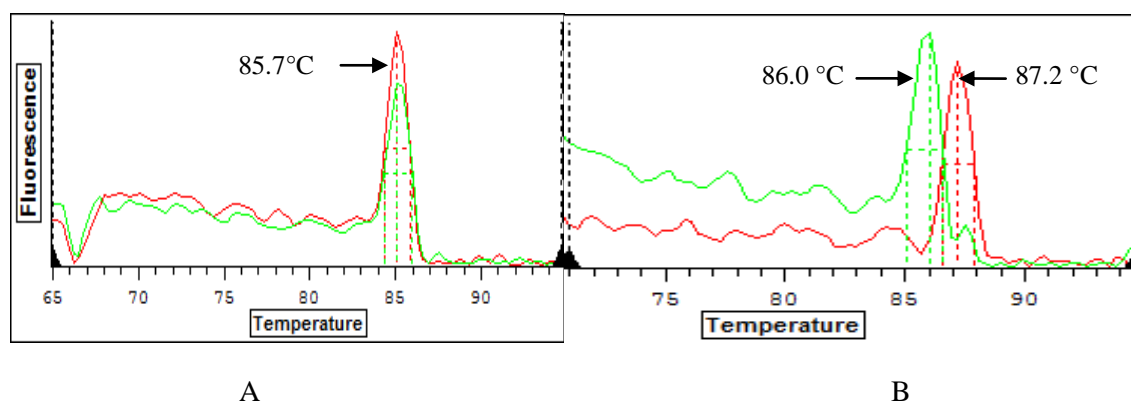


Figura 2. Análisis de Temperatura de Disociación (T_m) mediante RT-PCR Tiempo Real. A) Animales sanos, la curva verde representa un producto con T_m de 85.7°C. B) Animales enfermos, la curva verde muestra otro producto con T_m de 86 °C, y la curva roja muestra un producto con T_m de 87.2°C.

Las frecuencias de las temperaturas de disociación de los productos obtenidos en las crías sanas muestra la predominancia de un producto con T_m de 85.7 °C, mientras que en el grupo de crías enfermas el producto predominante posee una T_m de 86°C (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia relativa de las temperaturas de disociación (T_m) de los productos obtenidos con los oligonucleótidos para el Exón 1 de la IgA en animales sanos y enfermos. A) Animales sanos, la frecuencia relativa de la T_m predominante es de 85.7 °C. B) Animales enfermos la frecuencia relativa de la T_m predominante es de 86 °C.

Temperatura de disociación (T_m)	Sanos Frecuencia relativa (A)	Enfermos Frecuencia relativa (B)
85.4 °C	31%	2%
85.7 °C	56%	6%
86.0 °C	11%	66%
87.2 °C	2%	26%

4.3. Cuantificación relativa de ARNm de IgA

Cuando se empleó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para la comparación de expresión del ARNm de IgA frente a una muestra “calibrador” (crías de 1 día de edad), los resultados mostraron que el nivel promedio de expresión de ARNm de IgA en animales sanos es de 38.8 veces lo expresado por los animales nacidos de un día de edad. Por el contrario, los animales enfermos con enteropatía producen 113 veces lo expresado por los animales neonatos de un día de edad, lo que implica la expresión exacerbada de IgA durante los cuadros entéricos. La prueba de T de Student demuestra que la diferencia entre el grupo de animales sanos y enfermos es significativo ($p < 0.05$) indicando que esta observación no es un evento al azar. (Figura 3).

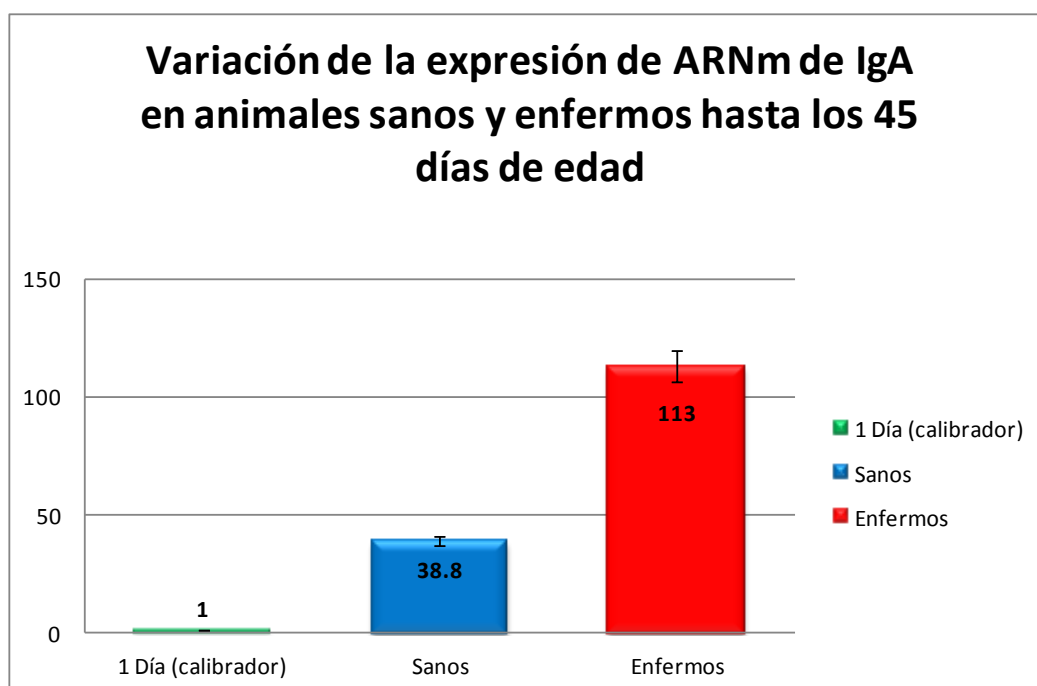


Figura 3. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas y enfermas con respecto al calibrador. Según estado sanitario en relación a la expresión al día de edad según el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en animales de cero a 45 días de edad. Cada barra representa la media \pm la SD de los dos grupos sanitarios evaluados. Existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de animales sanos y enfermos.

En los animales sanos los valores promedios de ciclos umbrales (Cts) por grupo etario para IgA fueron empleados para la cuantificación relativa de la expresión de ARNm de IgA, al compararlos con el grupo calibrador (crías de 1 día de edad aparentemente sana). Los resultados evidenciaron que al nacimiento, no hay expresión de IgA de manera autónoma sino que ésta se inicia al primer día de edad, de manera dramática tras haber consumido calostro. Los niveles de expresión promedio de ARNm de IgA con respecto al calibrador en crías de alpaca sanas

exhiben una tendencia creciente en las primeras 4 semanas de vida. Tras el primer día de nacidos, los niveles de expresión de ARNm de IgA se incrementan hasta 49 veces durante las primeras cuatro semanas respecto al calibrador, sin observarse diferencia significativa entre estos grupos etarios. Posteriormente, luego de la cuarta semana los niveles de expresión caen de manera discreta. Se observa la agrupación de los 6 grupos etarios en 3 grupos estadísticamente distintos según el nivel de expresión de ARNm de IgA (ANOVA $p < 0.05$). El primer grupo está representado por los animales correspondientes a la primera, segunda, tercera y cuarta semana de edad (49, 42, 46 y 46 veces, respectivamente), el segundo grupo está conformado por los animales de la quinta semana de edad (36 veces) y el tercer grupo está conformado por los animales de la sexta semana de edad (23 veces), según lo expresado en relación al calibrador (prueba de Tukey) (Figura 4).

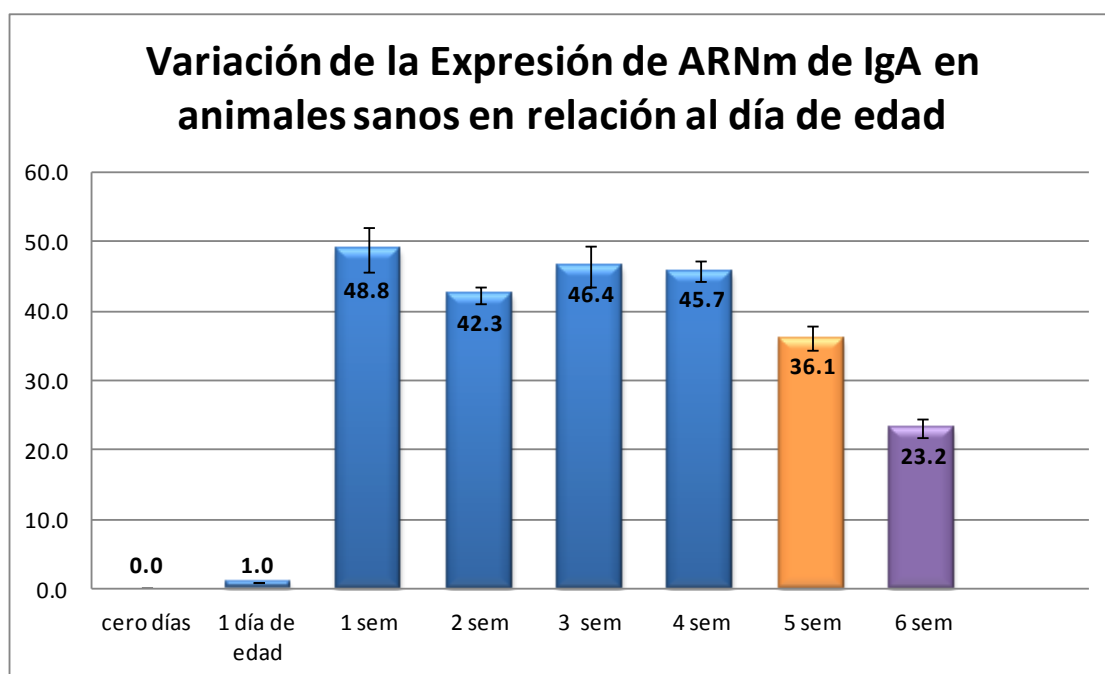


Figura 4. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas. Según análisis $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para la expresión de ARNm de IgA en animales sanos según edad. Cada barra representa la media \pm la SD de cada grupo etario evaluado. Observándose 3 grupos estadísticamente distintos ($p < 0.05$).

Los resultados muestran que los animales enfermos denotan expresión relativa de ARNm de IgA muy por encima de lo cuantificado para los animales de 1 día de edad (calibrador), llegando a producir durante la tercera semana de edad hasta 215 veces lo que éstos producen, luego los niveles de expresión descenden y se mantienen constantes entre la cuarta y la sexta semana en relación al calibrador. Se observa la agrupación de los 6 grupos etarios en 3 grupos estadísticamente distintos según el nivel de expresión de ARNm de IgA (ANOVA $p < 0.05$). El

primer grupo está conformado por los grupos etarios de la primera y segunda semana de edad (59 y 66.5 veces, respectivamente), el segundo grupo está conformado por los animales de la tercera semana de edad (215 veces) y el tercer grupo está representado por los animales correspondientes a la cuarta, quinta y sexta semana de edad (117.5, 120 y 117 veces, respectivamente), según lo expresado en relación al calibrador (prueba de Tukey) (Figura 5).

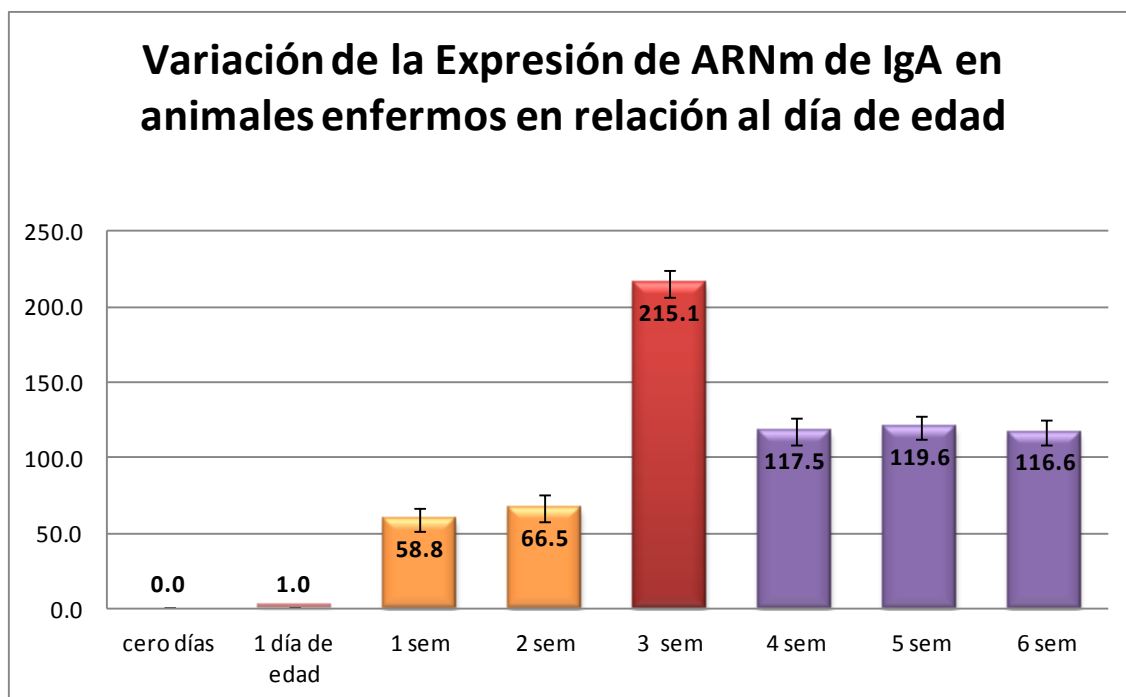


Figura 5. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas. Según análisis $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para la expresión de ARNm de IgA en animales enfermos según edad. . Cada barra representa la media \pm la SD de cada grupo etario evaluado. Observándose 3 grupos estadísticamente distintos ($p < 0.05$).

El análisis de expresión relativa de ARNm de IgA mediante la técnica $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hecho por estado sanitario señala que existe diferencia significativa (T de Student $p < 0.05$) entre ambos grupos sanitarios en general. Por otro lado al comparar sanos contra enfermos por grupos etarios con relación a los animales calibradores de 1 día de edad (Figura 6) también se encuentra diferencia significativa ($p < 0.05$) entre sanos y enfermos en cada semana de edad (T de Student).

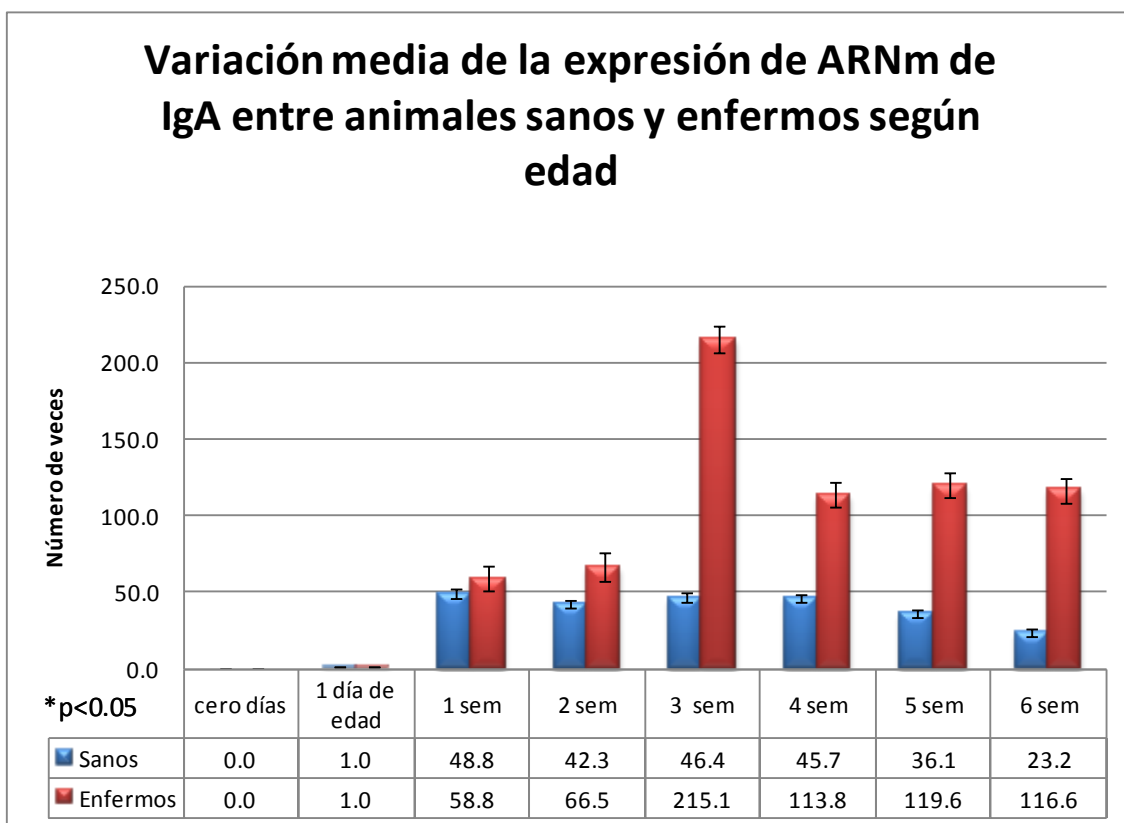


Figura 6. Variación de la expresión relativa de ARNm de IgA en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas y enfermas por semana de edad. Cada barra representa la media \pm la SD de los grupos etarios evaluados. Existió diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) dentro de cada grupo sanitario al comparar semanas consecutivas, así como al comparar sanos con enfermos por grupos etarios.

Estas diferencias revelan estimulación y activación de la respuesta humoral a nivel intestinal en crías de alpaca enfermas con enteropatía, particularmente importante en la quinta y sexta semana de edad donde los niveles de expresión de ARNm de IgA tienden a disminuir en animales aparentemente sanos.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha determinado la presencia del gen codificante del exón 1 de la IgA en muestras de epitelio intestinal de crías de alpacas; y se ha establecido su expresión relativa en los animales muestreados. Se utilizó la técnica de RT PCR tiempo real, debido a que no existen técnicas serológicas para determinar la presencia de IgA secretora en el epitelio intestinal en camélidos sudamericanos. En Argentina, se ha desarrollado una prueba ELISA para la detección de IgG e IgM para evaluar la respuesta humoral frente a patógenos sistémicos mediante la producción de antisuero específico en conejos empleando proteínas recombinantes (De Simone *et al.*, 2008).

La producción de información sobre los genomas de los camélidos, y en parte de los camélidos sudamericanos, nos ha permitido utilizar las herramientas moleculares para detectar genes de las inmunoglobulinas en las alpacas. Los oligonucleótidos diseñados con el programa Primer3 Output (www.primer3.com) para el Exón 1 de la IgA (Cuadro 1), lograron amplificar el producto específico (164 pb) en concordancia con el valor de temperatura de disociación (Tm) y su observación visual mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas en las corridas electroforéticas de los productos de PCR usando los oligonucleótidos diseñados para el Exón 1 de la IgA, evidencian que el gen del Exón 1 de la IgA está presente dentro del genoma de las alpacas y es expresado, siendo el ARNm de la IgA, detectado y cuantificado con los oligonucleótidos diseñados (Figura 1).

En los mamíferos, la síntesis de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas está regulada por cromosomas distintos. En esta síntesis participan varios segmentos de genes que combinados dan lugar a los genes funcionales responsables de la codificación de las cadenas de

las inmunoglobulinas. Estos segmentos están contenidos en los exones, que son aquellos fragmentos de ADN que serán transcritos para dar lugar a la síntesis de proteínas (Herzenberg *et al.*, 2000). De acuerdo a esto, nuestro análisis BLAST indica que los oligonucleótidos permiten identificar parte de un producto de 309 nucleótidos del locus IgH en la región del gen IgHV de la secuencia de la línea germinal de alpaca (*Vicugna pacos*), que comparte una identidad de 88% con el ARNm de la IgA del cerdo (*Sus scrofa*). Cabe mencionar que el diseño de los oligonucleótidos para la técnica del PCR es parte vital dentro de la prueba molecular, por esto debe tenerse las consideraciones del caso, para que los resultados sean los óptimos; reduciendo así, la posibilidad de amplificar productos inespecíficos (Wolcott, 1992).

La temperatura de disociación (T_m) de los productos obtenidos denota una alta especificidad de los oligonucleótidos diseñados. El análisis de la T_m de los productos de RT-PCR tiempo real obtenidos de animales sanos y enfermos identificó temperaturas de disociación muy cercanas entre sí pero diferentes entre los amplicones resultantes (Figura 1), existiendo predominancia de cierta temperatura en animales sanos ($T_m = 85.7^\circ\text{C}$) y de otra diferente en animales enfermos ($T_m = 86^\circ\text{C}$) (Cuadro 2). Esto determina la existencia de variantes de transcritos con diferencias muy ligeras en la composición de bases perceptible a través del tiempo real, ya que sus T_m son muy similares. Es posible que esto sea resultado de polimorfismos genéticos, específicamente de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que consiste en una variación de cierta secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) (Gould-Rothberg, 2001). Estos SNPs cuando se encuentran integrando exones dan lugar, en la mayoría de los casos, a proteínas con expresión, estructura o funciones biológicas alteradas y se conocen como SNPs codificantes (cSNPs) que predisponen a enfermedades y a una menor respuesta a bacterias, virus y toxinas. Otros SNPs pueden estar en zonas no codificantes (silenciosos) y no alterar el producto o su función (Irizarry *et al.*, 2000). Sin embargo, aún en ausencia de significado funcional, su proximidad a un determinado gen alterado, con el que segrega en forma conjunta, lo transforma en un indicador útil para detectar potenciales anomalías génicas (Campbell *et al.*, 2000). Según Taillon y Piernot (1999) determinaron que los dos tercios de los SNPs corresponden a la sustitución de una citosina (C) por una timina (T). Los SNPs actúan como improntas de nacimiento y su variedad caracteriza al grupo poblacional, cada individuo es portador de un patrón propio de SNPs que lo identifica y que comparte con su grupo étnico (Pfoest *et al.*, 2000). El presente trabajo no puede establecer con certeza la existencia de polimorfismos o isoformas procedentes de mecanismos de recombinación génica propias de la generación de los ARNm de IgA en alpacas. Es necesaria la realización del secuenciamiento nucleotídico de los productos del RT-PCR tiempo real para identificar tales variaciones y emplear técnicas avanzadas para

develar las implicancias de tales cambios y sus efectos sobre los individuos en caso se presenten.

Los niveles de expresión de los animales sanos de uno a 45 días de edad muestran niveles crecientes de producción relativa de ARNm de IgA a nivel de yeyuno en comparación con la producción al nacimiento y sin consumo de calostro. Al nacimiento, no hay producción de IgA de manera autónoma sino que la producción inicia al primer día de edad, tras haber consumido calostro (Figura 4). La IgA en la leche de los camélidos se encuentra en forma de IgA secretora; sin embargo, los niveles de ésta inmunoglobulina en la leche de camélidos es mucho más baja que la IgG total (Medina *et al.*, 2004). En bovinos, la IgA representa alrededor del 7% (no se absorben) de la concentración total de inmunoglobulinas presentes en el calostro, mientras que la IgG es alrededor del 85-90 % aunque la absorción de ésta se da en las primeras 6 horas de vida (Porto *et al.*, 2007). Además, el tipo de placenta epiteliochorial de los camélidos previene el pasaje de inmunoglobulinas al feto, similarmente a lo observado en rumiantes (Weaver *et al.*, 2000). Por lo tanto, los animales neonatos nacen hipogammaglobulinémicos y su capacidad de resistencia contra los patógenos depende de una adecuada absorción del calostro y la leche (De Genst *et al.*, 2006), siendo la inmunización pasiva a través del calostro crucial para la supervivencia del neonato (Ramírez, 2009).

Los resultados obtenidos con el RT-PCR en tiempo real, usando oligonucleótidos diseñados para el ARNm de la IgA, permitieron establecer que los animales neonatos aparentemente sanos que no habían tomado calostro no tienen presencia detectable de ARNm de IgA en la mucosa intestinal, siendo la producción detectable a partir del primer día de edad tras el consumo de calostro, debido a que la producción de IgA es dependiente del estímulo antigénico que está comenzando a presentarse con la colonización de microorganismos a nivel intestinal y también a las moléculas inductoras / reguladores de la respuesta inmune presente en el calostro y leche (Porto *et al.*, 2007). Asimismo, al 25 % de las muestras de animales sanos de diferentes edades no se les detectó el ARNm de IgA, esto puede ser debido a diversos eventos. En primer lugar, por la incapacidad de la prueba molecular de detectar ARNm de IgA carentes de la expresión del exón 1; ya que se ha demostrado que existen ratones carentes de exón 1 alfa, inducidas por altas dosis de LPS microbiano (Coffman *et al.*, 1989). En los animales que expresan IgA con el exón 1 (que son la gran mayoría de IgA) son reguladas por la presencia de la citoquina TGF- β que inducen al cambio de clase de inmunoglobulinas a nivel germinal (Ehrhardt *et al.*, 1992). En segundo lugar podría existir un número de animales inmunodeficientes que no puedan expresar la IgA, enfermedad denominada “deficiencia selectiva de IgA”, que se presentan en una proporción de 1:500 a 1:700 individuos en ratones y en humanos; y que está asociado a

alergias e infecciones recurrentes (Horowitz y Hong, 1975; Strober y Sneller, 1991). En este estudio se determinó que existen crías de alpacas sanas (25%) y enfermas (30%) con niveles de ARNm de IgA indetectables a través de la técnica de RT PCR tiempo real empleando los oligonucleótidos descritos, no asociándose a una susceptibilidad de enfermarse. Es posible también, que muchos individuos sanos presenten niveles basales de ARNm de IgA en cantidades no detectables, al no encontrarse estimulados para incrementar la producción de este anticuerpo.

Los niveles de expresión promedio de ARNm de IgA con respecto al calibrador en crías de alpaca sanas exhiben una tendencia creciente en las primeras 4 semanas de vida, incrementándose hasta 49 veces lo expresado respecto al calibrador encontrándose que no existe diferencia en la expresión, lo que indica la expresión alta y constante de esta inmunoglobulina durante este periodo. Posteriormente, a partir de la quinta y sexta semana los niveles de expresión caen de manera discreta, encontrándose que a la sexta semana se expresan 23 veces lo expresado al día de nacido (Figura 4). En ratones y humanos se ha demostrado que los niveles de IgA intestinal son bajos en las dos primeras semanas de edad y adquieren una mayor producción a partir de la cuarta semana (Brandtzaeg *et al.*, 2001). Los altos niveles de ARNm de IgA podrían estar asociadas a la presencia de moléculas inmunomoduladoras en calostro y leche junto con la estimulación de los antígenos de la microbiota que se está implantando durante este período a partir de la ingesta del alimento materno y posteriormente pasto natural (Porto *et al.*, 2007). El intestino es el lugar del organismo donde desde el momento del nacimiento existe el mayor y más constante estímulo antigénico por el continuo contacto con los antígenos alimentarios y los elementos de la flora intestinal normal (Strobel y Mowat, 1998). Con el paso de las primeras semanas de vida el sistema inmune de mucosas a nivel intestinal se enfrentará continuamente a microorganismos del medio ambiente presentes en suelo, pasturas o pezones contaminados de la madre (Cid y Martin, 2010). Así mismo, desde la segunda a tercera semana de edad ya el animal empieza a consumir pasturas que conlleva a un cambio de la microflora intestinal, activando una respuesta inmune de mucosa tanto innata como adaptativa poniendo en marcha mecanismos madurativos y adaptativos para mantener una barrera mucosa intestinal íntegra y activa e incorporar una población bacteriana normal estable (MacDonald, 2001), correlacionándose con los niveles de expresión de ARNm de IgA hasta la cuarta semana en animales sanos. La disminución de ARNm de IgA en la quinta y sexta semana podría relacionarse a procesos de tolerancia (supresión) inmunológica y sensibilización de antígenos alimentarios mediante la inducción de un mecanismo de un estado no específico de no respuesta inmunológica ya que el sistema inmune intestinal es capaz de procesar y distinguir entre los antígenos inocuos y los potencialmente lesivos (MacDonald, 2001; Strobel, 2001).

Algunos estudios sugieren que la inducción de tolerancia depende sobre todo del tipo de exposición al antígeno (Strobel y Mowat, 1998). Un resultado similar se aprecia en la producción de α - defensinas en la mucosa intestinal de las crías de alpacas, sugiriendo que los procesos adaptativos hacia antígenos alimentarios inocuos y microbiota intestinal saprófita se extiende desde la inmunidad innata hasta la inmunidad adaptativa de manera dinámica en tejido intestinal en periodos de tiempo similares (More, 2010).

Los resultados muestran que los animales enfermos denotan expresión relativa de ARNm de IgA muy por encima de lo cuantificado para los animales de 1 día de edad (calibrador), llegando a producir durante la tercera semana de edad hasta 215 veces lo que éstos producen, luego los niveles de expresión descienden y se mantienen constantes entre la cuarta y la sexta semana en relación al calibrador. A diferencia de los animales sanos, se aprecia que la producción de ARNm de IgA se mantiene desde la cuarta hasta la sexta semana de vida en relación al primer día de edad. Observándose 3 grupos estadísticamente distintos según el nivel de expresión de ARNm de IgA (ANOVA $p < 0.05$). El primer grupo está conformado por los grupos etarios de la primera y segunda semana de edad (59 y 66.5 veces, respectivamente), el segundo grupo está conformado por los animales de la tercera semana de edad (215 veces) y el tercer grupo está representado por los animales correspondientes a la cuarta, quinta y sexta semana de edad (117.5, 120 y 117 veces, respectivamente), según lo expresado en relación al calibrador (prueba de Tukey) (Figura 5). Lo que presume que la producción de ARNm de IgA ha de incrementarse siempre ante los cuadros entéricos de manera significativa, lo que indica la capacidad de los animales jóvenes para responder adecuadamente mediante esta inmunoglobulina (IgA) ante la aparición de microorganismos patógenos. Debido a la interacción de antígenos bacterianos con el tejido linfoide presente en el intestino, se genera un aumento en la producción de Inmunoglobulina A secretora (IgAs), la cual interviene en la primera línea de defensa del sistema inmune (Hosono *et al.*, 2003). Los cuadros entéricos no necesariamente destruyen todas las células B responsables de la producción de IgA sino que, dependiendo del patógeno(s) involucrado (s), un buen número pudiera mantenerse para lograr producir tal cantidad de ARNm de IgA y tratar de combatir la infección mediante inmunidad humoral (Bernard, 2005). Aún así, este mecanismo parece no ser suficiente para combatir este tipo de infecciones, particularmente cuando se trata de microorganismos productores de toxinas que producen muerte de enterocitos (necrosis) como *Clostridium perfringens* (Moro, 1987). Esto indica la necesidad de participación de otros mecanismos inmunes de tipo celular con función regulatoria, citotóxico y de memoria (Porporatto *et al.*, 2007), que permita responder ante un nuevo contacto con el antígeno, desencadenando por un lado una respuesta inmune celular y por otro, un estímulo para

que los linfocitos B se transformen en células plasmáticas productoras de IgA secretora antígeno-específica (Fagarasan *et al.*, 2001).

El análisis de expresión relativa de ARNm de IgA mediante la técnica $2^{-\Delta\Delta C_t}$ realizado por estado sanitario señala que existe diferencia significativa (T de Student $p<0.05$) entre ambos grupos sanitarios en general (Figura 3). Por otro lado al comparar sanos contra enfermos por grupos etarios con relación a los animales calibradores de 1 día de edad, también se encuentra diferencia significativa ($p<0.05$) entre sanos y enfermos en cada semana de edad (T de Student) (Figura 6). Estas diferencias revelan estimulación y activación de la respuesta humoral a nivel intestinal en crías de alpaca enfermas con enteropatía (Corthésy y Spertini, 1999; Zaldivar, 2002), particularmente importante en la quinta y sexta semana de edad donde los niveles de expresión de ARNm de IgA tienden a disminuir paulativamente en animales aparentemente sanos.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- Se identificó y demostró mediante la técnica de RT PCR tiempo real que las alpacas codifican y transcriben ARNm del exón 1 de la región Fc de IgA desde el primer día de edad, mas no al nacimiento; siendo su expresión relativa detectada y producida en el epitelio intestinal de crías de alpacas a partir de un día de edad, tanto en animales sanos como enfermos.
- 2.- Los animales sanos presentan una tendencia de expresión constante de ARNm de IgA hasta la cuarta semana de edad, con disminución discreta en las semanas subsiguientes, mientras que en los cuadros entéricos la producción de ARNm de IgA siempre es superior a lo expresado por los animales sanos, habiendo diferencias significativas ($p<0.05$) entre ambos grupos sanitarios (sanos 38.8 y enfermos 113 veces respectivamente, respecto del calibrador) desde la primera hasta la sexta semana de edad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. 2000. Cellular and molecular immunology. 4^a ed. Philadelphia: Saunders Company. p 31-8.
2. Almogren A, Senior BW, Kerr MA. 2007. A comparison of the binding of secretory component to immunoglobulin A (IgA) in human colostrum S-IgA1 and S-IgA2. Immunology. 120: 273-280.
3. Allen P, Dalton E. 1975. Studies on equine immunoglobulin. Immunology 18: 178-195.
4. Austin A, Haas K, Naugler S, Bajer A, Garcia-Tapia D, Estes D. 2003. Identification and characterization of a novel regulatory factor: IgA-inducing protein. The Journal of Immunology. 171: 1336-1342.
5. Banchereau J, Steinman R. 1998. Dendritic cells and the control. Immunity Nature 392: 245-252.
6. Belmonte L, Parodi C, Bare P, Baston M, Bracco M, Ruibal B. 2007. Papel de las células dendríticas en la infección por HIV y HCV. Medicina (B. Aires) 67: 63-70.
7. Bernard J. 2005. El laboratorio en el diagnóstico clínico. En: McPherson RA. Evaluación del funcionamiento de las inmunoglobulinas y la inmunidad humoral. 20^a ed. Madrid: Marbán. p 879-890.
8. Besser T, Gay C, McGuire T, Evermann J. 1988. Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. Journal of Virology 62: 2238-2243.

9. Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L., Dupont C, Desgranges C. 1998. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity*. 9: 277-287.
10. Braathen R, Hohman V, Brandtzaeg P, Johansen F. 2007. Secretory Antibody formation; Conserved Binding Interaction between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J. Immunol* 178: 1589-1597.
11. Brandtzaeg P. 1983. The secretory immune system of lactating human mammary glands compared with other exocrine organs. *Ann NY Acad Sci* 409:353-81.
12. Brandtzaeg P, Farstad I, Johansen F, Morton H, Norderhaug I, Yamanaka T, 1999. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev* 171: 45-87.
13. Brandtzaeg P, Baekkevold E, Morton H. 2001. From B to A the mucosal way. *Nat Immunol Suppl.* 2 (12): 1093-4.
14. Butler J. 1983. Bovine immunoglobulins: An augmented review. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 4: 43-67.
15. Butler J, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. 2000. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 100:119-30.
16. Bustinza V. 2001. LA ALPACA conocimiento del gran potencial Andino. Oficina de Recursos del Aprendizaje- Secciones publicaciones –UNA-Puno. 1ª ed. 496 p.
17. Campbell D, Valdes A, Spurr N. 2000. Making drug discovery a SN(i)P. *Drug Discov Today* 5: 388-396.
18. Cebra J, Periwal S, Lee G, Lee F, Shroff K. 1998. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 6 (Suppl. 1-2):13-8.
19. Celada A. 1994. Inmunología Básica. En Alvarez ZD, Regueiro JR, eds. Antígenos y anticuerpos: estructura de los anticuerpos. 1ª ed. Barcelona: Labor. p 133-160.
20. Cid M, Martín C. 2010. Diarreas neonatales en alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.
21. Coffman R, Lebman D, Shrader E. 1989. Transforming growth factor β specifically enhances IgA. Production by lipopoly saccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med* 170: 1039 – 1044.
22. Corthésy B, Spertini F. 1999. Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development. *Biol Chem* 380 (Suppl.11):1251-62.
23. Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(5): 299-305.

24. Cummings J, Antoine J, Azpiroz F, Bourdet R, Brandtzaeg P, Calder P, Gibson G, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuitjelaars S, Watzl B. 2004. Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition* 43 (Suppl. 2): 118-173.
25. De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K. 2006. Antibody repertoire development in camelids. *Dev Com Immunol* 30:187–198.
26. De Simone E, Saccodossi N, Ferrari A, Leoni J. 2008. Development of ELISAs for the measurement of IgM and IgG subclasses in sera from llamas (*Lama glama*) and assessment of the humoral immune response against different antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 126: 64-73.
27. Dickinson E, Gorga J, Garrett M. 1998. Immunoglobulin A supplementation abrogates bacterial translocation and preserves the architecture of the intestinal epithelium. *Surgery* 124:284-90.
28. Edmundson A, Ely K, Abola E, Schipper M, Panagiotopoulos N. 1975. Rotational allomerism and divergent evolution of domains in immunoglobulin light chains. *Biochemistry* 14: 3953-3961.
29. Elson O, Cong Y, Iqbal N, Weaver C. 2001. Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin Immunol* 13: 187-194.
30. Ebert, E. 1990. Intra-epithelial lymphocytes: interferon-gamma production and suppressor/cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol* 82:81-85.
31. Ehrhardt R, Strober W, Harriman R. 1992. Effect of transforming growth factor (TGF)-beta 1 on IgA isotype expression. TGF-beta 1 induces a small increase in sIgA + Bcells regardless of the method of B cell activation. *J Immunol*. 148: 3830 – 3836.
32. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. 2001. In situ class switching and differentiation to Ig-A producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 413:639-643.
33. Fagarasan S, Honjo T. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology* 3 (Suppl. 1): 63 -72.
34. Ferguson, A. 1977. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 18:921-937.
35. Ferrufino J, Taxa L, Angeles G. 1996. Normal histology of small bowel. *Rev Med Hered* 7:46-57.
36. Fey H, Messerli J, Sturzenegger N, Grolimund F. 1976. Methods of isolation, purification and quantification of bovine immunoglobulins. *Zentralbibliothek of Veterinaermedizin Reihe B* 23: 269-281.
37. Fujioka H, Emancipator S, Aikawa M, Huang DS, Blatnik F, Karban T, DeFife K, Mazanec M. 1998. Immunocytochemical colocalization of specific immunoglobulin A with sendai virus protein in infected polarized epithelium. *J Exp Med* 188: 1223-1229.

38. Golsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. 2003. Antibodies: structure and function. 5a ed. Filadelfia: WB Freeman Company. p 76-104.
39. Gould-Rothberg B. 2001. Mapping a role for SNPs in drug development. *Nat Biotechnol* 19: 209-211.
40. Guarner F, Malagelada J. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512-519.
41. Guarner F. 2007. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp* 22(Suppl. 2):14-9.
42. Guy-Grand D, Azogui O, Celli S, Darche S, Nussenzweig M, Kourilsky P, Vassalli P. 2003. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med* 197:333-341.
43. Hathaway L, Kraehenbuhl J. 2000. The role of M cells in mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 57 (Suppl.2): 323-32.
44. Hecht G. 1999. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 277: 351-358.
45. Herzenberg L, De Rosa S. 2000. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 21:383-390.
46. Hicrman S, Kornfeld S. 1978. Effect of tunicamycin on IgM, IgA and IgG secretion by mouse plasmacytoma cells. *J Immunol* 121: 990-996.
47. Hornef M, Wick M, Rhen M, Normark S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology* 3(Suppl.11): 1033-1040.
48. Horwitz S, Hong R. 1975. Selective IgA deficiency: some perspectives in man and animals. *Sinaver associates Inc Sunderland* 12: 129 – 153.
49. Hosono A, Ozawa A, Kato R, Ohnishi Y, Nakanishi Y, Kimura T, Nakamura R. 2003. Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 758-764.
50. Huber R, Deisenhofer J, Colman P, Matsushima M, Palm W. 1976. Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* 264: 415-420.
51. Irizarry K, Kustanovich V, Li C, Brown N. 2000. Genomewide analysis of single nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. *Nat Genet* 26: 233-236.
52. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:444-450.
53. Janeway CA Jr. 2002. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 3: 1167- 1171
54. Janeway CA Jr, Medzhitov R. 2002. *Annu Rev Immunol.* 20:197-216.

55. Jiang H, Thurnheer M, Zuercher A, Boiko N, Bos N, Cebra J. 2004. Interactions of commensal gut microbes with subsets of B- and T-cells in the murine host. *Vaccine* 22: 805-811.
56. Johansen F, Braathen R, Brandtzaeg P. 2001. The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J Immunol* 167: 5185-5192.
57. Johansen F, Brandtzaeg P. 2004. Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. *Trends Immunol* 25 (Suppl. 3): 150-157.
58. Junqueira L, Carneiro J. 2000. *Histología básica*. 5^a ed. Barcelona: Masson. p 294 – 309.
59. Kaiserlian D., Cerf-Bensussan N., Hosmalin A. 2005. The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. *J Leukoc Biol* 78: 311-318.
60. Karlsson J., Pütsep K., Chu H., Kays R., Bevins C., Andersson M. 2008. Regional variations in Paneth cell antimicrobial peptide expression along the mouse intestinal tract. *BMC Immunology* 9: 37.
61. Klobasa F, Butler J, Werhahn E, Habe F. 1986. Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 11: 149-159.
62. Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellenhofer G, Hoess A, Wölle J, Plückthun A, Virnekäs B. 2000. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296(Suppl.1): 57-86.
63. Lamm M (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51: 311- 340
64. Leatherbarrow R, Bademacher T, DWEK R. 1985. Effector functions of a monoclonal aglycosylated mouse IgG 2a: binding and activation of complement component C1 and interaction with the human monocyte Fc receptor. *Mol Immunol* 22: 407- 415.
65. Lefrancois L, Masopust D. 2002. T cell immunity in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Curr Opin Immunol* 14:503-508.
66. Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} Method. *Elsevier Science* 25: 402-408.
67. Lu L., Walker W. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 73: 1124-1130.
68. MacDonald T. 2001. The reaction of the immune system to pathogens but not food antigens and commensal bacteria. *Semin Immunol* 13:159-161.
69. Macpherson AJ, Uhr T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303:1662- 1665.
70. Maki, M, Collin P. 1997. Coeliac disease. *Lancet* 349:1755-1759.

71. Maris S. 2004. Células M (membranosas) del aparato digestivo: su rol en la iniciación de la respuesta inmune mucosa. *Rev Méd Rosario* 70 (Suppl.2): 91-93.
72. Mayer L. 2003. Mucosal Immunity. *Pediatrics* 111(Suppl. 6): 1595-1600.
73. Medina M, Fernandez F, Saad S, Rebuffi G, Yapur J. 2004. Inmunoglobulinas g de cadenas pesadas en la leche de los camélidos sudamericanos. *J Neotrop Mammal* 11(1): 19-26.
74. Medzhitov R. 2001. Toll- like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 134-145.
75. Melchers F. 2005. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 5: 578-84.
76. Mestecky J, Moldoveanu Z, Elson C. 2005. Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens. *Vaccine* 23: 1800–1803.
77. Montalvo C. 1996. Contribución al estudio de la morfología de la alpaca (*Lama pacos*) Estudio histológico e histoquímica del intestino. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 65 p.
78. More J. 2010. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos α y β defensinas en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 83p.
79. Moro, M. 1987. Enfermedades infecciosas de las alpacas. *Revista de Camélidos Sudamericanos* 4: 7-31.
80. Mowat A. 2003. Anatomical basics of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3 (Suppl.4) 331-341.
81. Nathanson N, Ahmed R, Biron C, Brinton M, Gonzalez–Scarano F, Griffin D, Holmes K, Murphy F, Overbaugh J, Richman D, Robertson E, Robinson H. 2007. *Viral Pathogenesis and Immunity*. 2^a ed. London: Academic Press. p 72-88.
82. Nose M, Wigzell H. 1983. Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc. Natl Acad Sci USA* 80: 6632-6636.
83. Olden K, Bernard B, White S, Parent J. 1982. Function of the carbohydrate moieties of glycoproteins. *J Cell Biochem* 18: 313-320
84. O'Neill L. 2004. After the toll rush. *Science* 303:1481-1482.
85. Oswald I. 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *EDP Sciences* 37: 59–368 359.
86. Ouellette A., Selsted M. 1996. Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* 10: 1280-1289
87. Ouellette A. 1999. Mucosal Immunity and Inflammation. IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277: 257-261

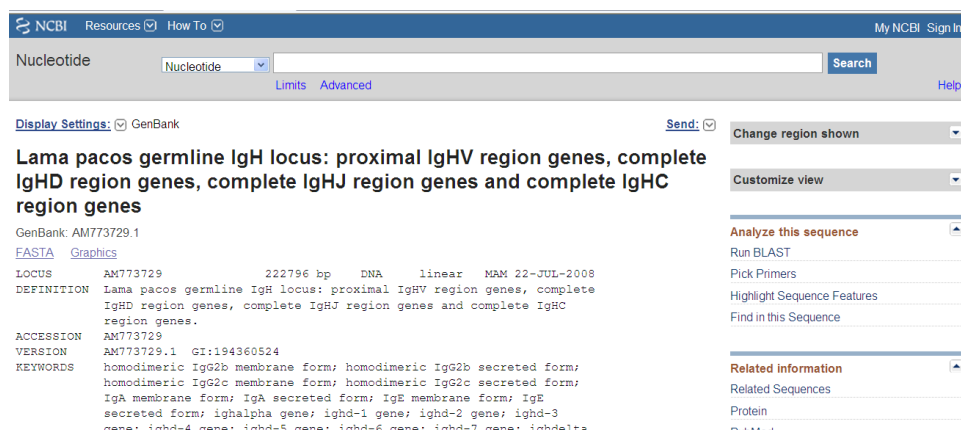
88. Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl J, Edelman L, Sansonetti P, Corthesy B. 2002. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* 17: 107-15.
89. Parvari R, Avivi A, Lentner F, Ziv E, Tel-Or S, Burstein Y, Schechter I. 1988. Chicken immunoglobulin γ - heavy chains. Limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.* 7: 739- 44.
90. Patil A, Hughes A, Zhang G. 2004. Rapid evolution and diversification of mammalian α -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 20: 1-11.
91. Peppard J, Orlans E, Payne A, Andrew E.1981. The elimination of circulating complexes containing polymeric IgA by excretion in the bile. *Immunology* 42: 83-89.
92. Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.*29: 9.
93. Pinilla B, Cubillos K, Rodríguez M. 2008. Bodas de Plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *NOVA - Publicación científica en ciencias biomédicas.* 6(9): 1794-2470.
94. Pfost D, Boyce-Jacino M, Grant D. 2000. A SNPshot: pharmacogenetics and the future of drug therapy. *Trends in Biotechnology* 18: 334-338.
95. Podolski D. 1999. Mucosal Immunity and Inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277: 495-499.
96. Porporatto C, Bianco I, Correa S. 2007. Modulation of the mucosal immune system with polysaccharides Basis for an attractive therapeutic alternative. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 41 (Supl.2): 203-211.
97. Porter P. 1969. Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their absorption by the neonatal piglet. *Biochim Biophys Acta* 181: 381-392.
98. Porto A, Oliveira L, Ferraz L, Thomaz S, Rosa J, Roque-Barreira M. 2007. Isolation of bovine immunoglobulins resistant to peptic digestion: new perspectives in the prevention of failure in passive immunization of neonatal calves. *J Dairy Sci* 90: 955-962.
99. Putnam F, Liu Y, Low T. 1979. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease digestion, Fab and Fc fragments and the complete amino acid sequence of the α 1 heavy chain. *J Biol Chem* 254: 2865- 2874.
100. Ramirez M. 2009. La inmunoglobulina A secretoria en la mucosa intestinal de camélidos sudamericanos. *Sistema de Revisiones en Investigaciones Veterinarias de San Marcos.* [Internet], [23 Enero 2011]. Disponible en: http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/files/Articulo_mercy_Final.pdf

101. Rengarajan J, Szabo S, Glimcher L. 2000. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology Today* 21 (Suppl. 10): 479-483
102. Rey J, Garin N, Spertini F, Cortesby B. 2004. Targeting of secretory IgA to peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *J Immunol* 172: 3026-3033.
103. Rockey J, Hanson L, Heremans J, Kunkel H. 1964. Beta-2A globulinemia In Two Healthy Men *J Lab Clin Med.* 63: 205-212.
104. Royle L, Roos A, Harvey D, Wormald M, Gijlswijk V, Redwan R. 2003. Secretory IgA N and O-glycans provide a link between the innate and adaptative immune systems. *J Biol Chem* 278: 20140-53.
105. Ruiz V, Puig Y, Rodríguez M. 2010. Intestinal microbiota, immune system and obesity. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 29 (Suppl.3): 364-397.
106. Russell M, Bobek L, Brock J. 2005. Innate humoral defense factors. In: Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee J, Mayer L ,eds. *Mucosal Immunology*. 3a ed. San Diego: Academic Press/Elsevier. p 73-93.
107. Sánchez, C., López-Fierro, P., Zapata, A., Domínguez, J. 1993. Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulins. *Fish & Shellfish Immunology* 3: 237-251.
108. Selby W, Janossy G, Bofill M, Jewell D. 1983. Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 52:219-228.
109. Strieter R, Belperio J, Keane M. 2002. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 109: 699-705.
110. Strober W, Sneller M. 1991. IgA deficiency. *Ann Allergy* 66: 363 – 375.
111. Strobel S, Mowat A. 1998. Immune responses to dietary antigens:oral tolerance. *Immunol Today* 19:173-181.
112. Strobel S. 2001. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance versus desensitisation. *Proc Nutr Soc* 60:437- 442.
113. Su C, Nguyen V, Nei M. 2002. Adaptive evolution of variable region genes encoding an unusual type of immunoglobulin in camelids. *Mol Biol Evol* 19 (Suppl. 3): 205–215.
114. Summerfield A, Guzylack-Piriou L, Schaub A, Carrasco CP, Tache V, Charley B, McCullough KC. 2003. Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* 110: 440-449.
115. Summerfield A, McCullough K. 2009. The porcine dendritic cell family. *Dev Comp Immunol* 33: 299-309.
116. Taillon Miller, Piernot E. 1999. Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery. *Genome Res* 9: 499-505.

117. Teixeira M, Almeida I, Gazzinelli R. 2002. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect* 4: 883-336.
118. Tizard I. 2002. *Inmunología Veterinaria*. 6^a ed. Madrid: McGraw-Hill. 517 p.
119. Tonegawa S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575-581.
120. Traber P, Silberg D. 1996. Intestine specific gene transcription. *Annu Rev Physiol* 58: 275 - 297
121. Van der Waaij L, Limburg P, Mesander G, Van der Waaij D. 1996. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 38 (Suppl. 3): 348-354.
122. Van der Waaij L, Kroese F, Visser A, Nelis G, Westerveld B, Jansen P, Hunter J. 2004. Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 669-674.
123. Van Beer H, Buller H, Grand R, Einerdhand A, Dekker J. 1995. Intestinal Brush Border Glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit Rev Biochem Mol Biol*
124. Vaerman J, Querinjean P, Heremans, J. 1971. Studies on the IgA system of the horse. *Immunology* 21 (Suppl.3): 443-454.
125. Velasco N. 2006. Gut barrier in the critically ill patient: facts and trends. *Rev Méd Chile* 134: 1033-1039.
126. Walker-Smith J. 1990. Management of infantile gastroenteritis. *Arch Dis Child* 65: 917-918.
127. Weaver D, Tyler J, Scott M, Wallace L, Marion R, Holle J. 2000. Passive transfer of colostral immunoglobulin G in neonatal llamas and alpacas. *Am J Vet Res* 61 (Suppl.7): 738 – 740.
128. Wernery U. 2001. Camelid immunoglobulins and their importance for the new-born- A Review. *J Vet Med B* 48:561–568.
129. Winkelhake J, Nicolson G. 1976. Aglycosylantibody. *J Biole Chem* 251: 1074-1080.
130. Wolcott M. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin. Microbiol. Rev.* October 1992 5:370-386.
131. Yamanaka T, Helgeland L, Farstad I, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. 2003. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *Immunol* 170:816-22.
132. Yuan Q, Walker W. 2004. Innate Immunity of the Gut: Mucosal Defense in Health and Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition JPGN* 38: 463-473.
133. Zaldivar M. 2002. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev Cubana Méd Gen Integr* 5: 24-36.

VIII. ANEXOS

Anexo I: Línea germinal del locus IgH para el Exón 1 de la región constante de la cadena pesada de la IgA publicado en el Banco de genes con N° acceso: AM773729.1:



NCBI Resources How To My NCBI Sign In

Nucleotide Nucleotide Search Limits Advanced Help

Display Settings: GenBank Send: Change region shown Customize view

Lama pacos germline IgH locus: proximal IgHV region genes, complete IgHD region genes, complete IgHJ region genes and complete IgHC region genes

GenBank: AM773729.1

FASTA Graphics

LOCUS AM773729 222796 bp DNA linear MAM 22-JUL-2008

DEFINITION Lama pacos germline IgH locus: proximal IgHV region genes, complete IgHD region genes, complete IgHJ region genes and complete IgHC region genes.

ACCESSION AM773729

VERSION AM773729.1 GI:194360524

KEYWORDS homodimeric IgG2b membrane form; homodimeric IgG2b secreted form; homodimeric IgG2c membrane form; homodimeric IgG2c secreted form; IgA membrane form; IgA secreted form; IgE membrane form; IgE secreted form; ighalpha gene; ighd-1 gene; ighd-2 gene; ighd-3 gene; ighd-4 gene; ighd-5 gene; ighd-6 gene; ighd-7 gene; ighdelta

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Related Sequences

Protein

ANEXO II: Secuencia del Exon 1 de la región constante de la cadena pesada de la IgA partir de la secuencia publicada en el Banco de Genes para la línea germinal de alpaca (*Vicugna pacos*) AM773729.1

tcagagcct gcaaccagcc ccagcgtctt cccgctgggc cccagctatg acaaggcatc caggcaggtg
gtccttgccct gcctgtgtcca cggcttcttc ccaccggcgc ccctgaaggt gacatggggc ctcagtggcc
agaacgtgtc cgctcatggac ttccccaccg tgcagcctgc ctccgggggc ctgtacacca tgagcagcca

gtgaccacg ccagttgagc agtgcccaga cagcgagatc gtgacatgcc aagtgcagca cctctccagc
tccagccaga cagtgaacgt gcctgcaga

ANEXO III. Resultados de la cuantificación relativa de IgA de mucosa intestinal de alpacas sanas (*Vicugna pacos*) con respecto al calibrador

	MUES TRA #	MUESTRA	EDAD	Ct IgA	Ct IgA prom edio	Ct GAPDH	Ct GAPDH promedio	2 delta- delta	2 delta- delta Prom - Edad	GRUPO	Varianza	SD	CV
Grupo 0 (calibrador)	1	Alp 03	1 día	25.1	25.1	22.01	22.0	0.12	1	4.6			
Grupo 1 (1- 7 días)	2	Alp 15	1 día		21.91	25.54	24.84		5.73		0.14	0.38	0.07
	3	Alp 07	2 días	19.68		22.10		5.37					
	4	Alp 04	3 días	22.17		24.65		5.58					
	5	Alp 05	4 días	20.79		23.46		6.36					
	6	Alp 09	5 días	22.90		25.37		5.53					
	7	Alp 14	6 días	23.08		25.50		5.36					
	8	Alp 01	7 días	23.08		25.64		5.88					
	9	Alp 06	7 días	21.65		24.25		6.04					
	10	Alp 12	7 días			27.03							
Grupo 2 (8- 14 días)	11	Alp 42 ('10)	8 días	22.77	21.65	25.05	24.39	4.86	4.97		0.02	0.16	0.03
	12	Alp 08	10 días	20.52		22.86		5.08					
	13	Alp 25 (MDB - 215209)	11 días			25.27							
Grupo 3 (15- 21 días)	14	Alp 28 (10')	15 días		23.07	25.76	25.78		5.45		0.11	0.33	0.06
	15	Alp 44 (10')	16 días			27.39							
	16	Alp 17	17 días	26.35		28.86		5.70					
	17	Alp 38 (10')	18 días			25.80							
	18	Alp 26 (MDB- 096109)	18 días	22.45		24.94		5.60					
	19	Alp 21	19 días	24.69		27.23		5.81					
	20	Alp 23 (10')	20 días	22.24		24.60		5.13					
	21	Alp 20	20 días	20.82		23.13		4.96					
	22	Alp 27 (MDB - 192209)	21 días	21.85		24.31		5.50					
Grupo 4 (22- 28 días)	23	Alp 11	27 días	24.57	24.21	27.03	26.63	5.49	5.37		0.03	0.18	0.03
	24	Alp 02	28 días	23.85		26.24		5.24					
Grupo 5 (29- 35 días)	25	Alp 10	30 Días		23.96	27.07	26.25		4.24		0.04	0.20	0.05
	26	Alp 23	30 Días			26.27							
	27	Alp 43 (10')	31 días	24.08		26.11		4.08					
	28	Alp 24 (MDB - 024109)	31 Días	25.23		27.28		4.14					
	29	Alp 30 (MDB - 039109)	32 Días	21.40		23.47		4.20					
	30	Alp 19	33 Días	25.11		27.29		4.53					
Grupo 6 (36- 45 días)	31	Alp 22	36 días		23.96	26.30	25.86		2.72		0.03	0.16	0.06
	32	Alp 28 (MDB - 065109)	37 Días	21.34		22.81		2.77					
	33	Alp 29 (MDB - 018109)	37 Días	24.74		26.27		2.89					
	34	Alp 18	39 días	23.92		25.34		2.68					
	35	Alp 27 (10')	40 días	22.65		24.01		2.57					
	36	Alp 31 (MDB - 122104)	41 Días	24.68		26.04		2.57					
	37	Alp 13	42 días	25.03		26.42		2.62					
	38	Alp 32	42 Días	23.27		24.86		3.01					
	39	Alp 29 (10')	45 días	26.01		27.43		2.68					
	40	Alp 16	45 días			29.15							

ANEXO IV. Resultados de la cuantificación relativa de IgA de mucosa intestinal de alpacas enfermas (*Vicugna pacos*) con respecto al calibrador

	MUES TRA #	MUESTRA	Edad	Ct IgA	Ct IgA promedio	Ct GAPDH	Ct GAPDH promedio	2delta	Prom- Edad	GRUPO	Varia nza	SD	CV
Grupo 0 (calibrador)	1	Alp 03 (09')	1 día	25.1	25.1	22.01	22.0	1.00	1	113.0			
Grupo 1 (1- 7 días)	2	Alp 35	1 días	25.17	26.41	27.59	29.17	45.57	58.85		65.46	8.09	0.14
	3	Alp 13	3 días	26.60		29.49		63.16					
	4	Alp 08	4 días			29.03							
	5	Alp 19	5 días			29.21							
	6	Alp 16	6 días	26.75		29.60		61.39					
	7	Alp 22	6 días	28.10		31.05		65.71					
	8	Alp 05	7 días	25.15		28.08		64.89					
	9	Alp 09	7 días	26.70		29.32		52.35					
Grupo 2 (8- 14 días)	10	Alp 10	8 días	25.43	25.95	28.13	29.20	55.33	66.54		77.30	8.79	0.13
	11	Alp 21	9 días	23.17		26.02		61.39					
	12	Alp 32	10 días	27.24		30.37		74.54					
	13	Alp 07	10 días			30.01							
	14	Alp 41	10 días	27.14		30.08		65.34					
	15	Alp 36	7- 14 días			29.89							
Grupo 3 (15- 21 días)	16	Alp 34	14 días	26.76	23.08	29.92	28.08	76.11	215.08		72.44	8.51	0.04
	17	Alp 01	15 días										
	18	Alp 24	15 días	21.73		26.39		215.27					
	19	Alp 37	15-18 días	22.10		26.76		215.27					
	20	Alp 11	20 días			29.42							
	21	Alp 26	20 días	21.02		25.59		202.11					
	22	Alp 30	20 días			28.44							
	23	Alp 02	21 días	26.03		30.70		216.77					
Grupo 4 (22- 28 días)	24	Alp 45	21 días	24.53	24.78	29.26	29.63	225.97	117.54		74.53	8.63	0.07
	25	Alp 48	22 días			31.11							
	26	Alp 06	20-25 días			30.26							
	27	Alp 25	25 días	26.45		30.16		111.43					
Grupo 5 (29- 35 días)	28	Alp 47	27 días	23.11	24.37	26.97	28.18	123.64	119.62		62.32	7.89	0.07
	29	Alp 03(10')	30 días										
	30	Alp 39	30 días	23.00		26.73		112.99					
	31	Alp 40	30 días	26.04		29.78		113.77					
	32	Alp 46	30 días	23.38		27.31		129.79					
Grupo 6 (36- 45 días)	33	Alp 04	35 días	25.06	24.85	28.90	29.24	121.94	116.62		69.46	8.33	0.07
	34	Alp 12	35-40 días			31.07							
	35	Alp 31	35-40 días	23.74		27.45		111.43					
	36	Alp 33	35-40 días	26.55		30.27		112.21					
	37	Alp 20	40 días	24.27		28.16		126.24					